



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

9
201

FACULTAD DE QUIMICA



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

POLIMORFISMO DE LOS GENES TAP
EN LA AUTOINMUNIDAD

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

SANDRA BALLADARES MACEDO



MEXICO, D. F.

268302

1998

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Química

Polimorfismo de los genes TAP en la autoinmunidad

Tesis

Que para obtener el título de:

Químico Farmacéutico Biólogo

Presenta:

Sandra Balladares Macedo

México, D.F.

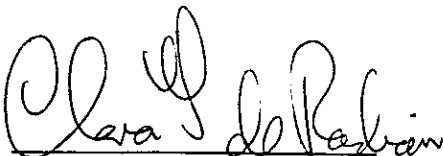
1998

JURADO ASIGNADO:

Presidente: Prof. **MARISOL LOPEZ LOPEZ**
Vocal: Prof. **SATURNINO DE LEON CHAPA**
Secretario: Dra. **CLARA GORODEZKY LAUFERMAN**
1er. Suplente: Prof. **ALICIA CERVANTES PEREDO**
2º. Suplente: Prof. **ROSANA PELAYO CAMACHO**

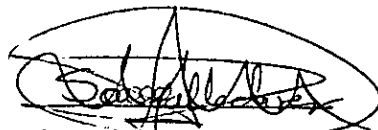
SITIO DONDE SE DESARROLLO LA TESIS:

Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Inmunogenética
Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológico INDRE, SSA



Dra. Clara Gorodezky Lauferman

Directora de la tesis



Sandra Balladares Macedo

Sustentante

AGRADECIMIENTOS

Agradezco de manera especial el apoyo de la Dra. Clara Gorodezky, por toda su enseñanza y su asesoría en los diversos aspectos de realización de esta tesis y por su apoyo en muchas otras cosas más, por su atención a cada momento, y por ocuparse de mí no sólo en mi desarrollo profesional.

A Carmen y Angélica por su valiosa asesoría y por el tiempo que invirtieron en mí. A Lalo por su ayuda en el análisis estadístico, ilustraciones, y por estar conmigo cuando se insubordina la computadora.

A todos mis amigos del laboratorio: Hector, Miriam, Ana, Arturo, Elva, Mónica, Ena, Ricardo, por sus valiosas aportaciones y por hacerme la estancia agradable en el laboratorio. A Gloria y Reina por su apoyo incondicional en todo momento.

Al personal del Laboratorio de Salud Pública del Estado de Sonora : MJ Pujol, C. Duran, JL Navarro, por habernos proporcionado las muestras de los seris. al Dr. Carlos Robles del Instituto Nacional de Pediatría por las muestras de los pacientes con DMDI. Al Dr. Ruben Burgos del Hospital General de México por las muestras de artritis reumatoide. Al Dr. Adolfo Chávez del Centro Médico Nacional siglo XXI, IMSS, por las muestras de cardiopatía reumática, y a la Dra. Lourdes Arellanes de la Asociación para Evitar la Ceguera en México por las muestras de VKH.

A todos aquellos que de alguna forma contribuyeron a la realización de este trabajo:

GRACIAS

DEDICATORIAS

Con todo cariño a mis padres Griselda y Félix por su apoyo, cariño y porque se merecen todo lo mejor de mi.

A mis hermanas Yesenia, Janet y Lorena, y a Sergio por su cariño y el interés mostrado en mi desarrollo profesional.

A mis sobrinos Braulio y Yesi, porque me relajan y hacen feliz con su presencia.

A Clarita, porque quiero manifestarle mi más sincera admiración, y porque este trabajo es nuestra primer obra.

A Lalo por su apoyo y ayuda incondicional en todo momento.

A Claudine y Ricardo porque son algo muy importante para mi, que a pesar de estar ahora lejos nos seguimos manteniendo cerca.

A la familia Irlés por su apoyo, interés y preocupación.

A mis demás amigos que no son menos importantes: Manuelito, Ingrid, Itzel, Arturo, Lulu, Angel, Lalo P, Mitzi, Manuel S y demás Q'fos con quienes he compartido una larga trayectoria.

A mis profesores de la facultad.

A Raquel y mis amigos de toda la vida que no terminaría de mencionar.

A aquella persona que en algún momento me ha dedicado parte de su tiempo y de su atención y que ha compartido conmigo grandes momentos.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por haberme abierto las puertas del conocimiento, mismo que me ha permitido tener una mejor comprensión del Universo y de la vida, luz para apreciar y elegir con libertad lo bueno, lo bello y lo verdadero.

DESIDERATA

*Camina placido entre el ruido y la prisa,
y piensa en la paz que se puede encontrar en el silencio.
En cuanto sea posible y sin rendirte,
mantén buenas relaciones con todas las personas.
Enuncia tu verdad de una manera serena y clara,
y escucha a los demás incluso al torpe e ignorante,
también ellos tienen su propia historia.
Esquiva a las personas ridículas y agresivas,
pues son un fastidio para el espíritu.
Si te comparas con los demás, te volverás vano y amargado
pues siempre habrá personas más grandes y más pequeñas que tú.
Disfruta de tus éxitos, lo mismo que de tus fracasos,
mantén el interés en tu propia carrera por humilde que sea
ella es un verdadero tesoro en el fortuito cambiar de los tiempos.
Se cauto en los negocios pues el mundo esta lleno de engaños,
más no dejes que esto te vuelva ciego para la virtud que existe.
Se sincero contigo mismo, en especial no finjas afecto
y no seas cínico en el amor,
en medio de todas las friolidades y desengaños
es perenne como la hierba.
Acata dócilmente el consejo de los años
abandonando con donaire las cosas de la juventud.
Cultiva la firmeza del espíritu
para que te proteja de las adversidades repentinas.
Muchos de los temores nacen de la fatiga y la soledad.
sobre una sana disciplina se benigno contigo mismo.
Tu eres una criatura del universo,
no menos que las plantas y las estrellas,
tienes derecho a existir.
Ya sea que te resulte claro o no*

*indudablemente el universo marcha como debiera
por eso debes estar en paz con Dios
cualquiera que sea tu idea de él.
Sean cualesquiera tus trabajos y aspiraciones
conserua la paz con tu alma en la bulliciosa confusión de la vida.
Asín con toda su farsa, penalidades y sueños fallidos,
el mundo es todavía hermoso.
Se cauto, esfuérzate por ser feliz.*

M. Elmann

INDICE

I. Abreviaturas	5
II. Resumen	6
III. Introducción	8
1. <i>El complejo principal de histocompatibilidad</i>	8
A. Estructura de los antígenos de clase I	8
B. Función de las moléculas de clase I	9
C. Estructura de los antígenos de clase II.	10
D. Función de las moléculas de clase II	11
E. Vías alternas de procesamiento antigénico	13
2. <i>Moléculas TAP</i>	15
A. Estructura y función	15
B. Polimorfismo de los genes TAP	19
C. Nomenclatura	19
3. <i>Aspectos clínicos e inmunogenéticos de los padecimientos incluidos en el estudio.</i>	22
A. MHC y autoinmunidad	22
B. Diabetes mellitus dependiente de insulina o tipo I	27
a) Antecedentes genéticos.	28
b) Implicación de TAP en DMDI	30
C. Artritis reumatoide	31
D. Cardiopatía reumática	34
E. Síndrome de Vogt Koyanagi Harada	35
F. Implicación de TAP en otras enfermedades	37
IV. Objetivos	40
1. <i>Objetivos generales</i>	40
2. <i>Objetivos particulares</i>	40
V. Justificación	41
VI. Hipótesis	41
VII. Material y métodos	42

1. Poblaciones de estudio	42
2. Equipo, material y reactivos	44
3. Métodos	44
A. Extracción y purificación del DNA genómico	44
a) Obtención de las muestras y lisis con $MgCl_2$ y nonidet p-40. Obtención de núcleos	45
b) Obtención de DNA mediante digestión con proteinasa K ⁹²	47
c) Extracción con fenol cloroformo ⁹²	47
d) Precipitación con isopropanol absoluto	48
B. Tipificación de los genes TAP por PCR-ARMS	48
a) Amplificación del DNA por PCR-ARMS	49
b) Verificación de la amplificación	52
4. Análisis estadístico	54
VIII. Resultados	58
IX. Discusión	80
X. Conclusiones	87
XI. Apéndice	89
XII. Bibliografía	93

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1 : Nomenclatura oficial de los alelos TAP1	25
Cuadro 2: Nomenclatura oficial de los alelos de TAP2	26
Cuadro 3: Alelos TAP asociados a DMDI reportados en otras poblaciones	33
Cuadro 4: Alelos de TAP asociados a otras enfermedades	39
Cuadro 5: Poblaciones incluidas en el estudio	46
Cuadro 6 : Secuencias de los iniciadores utilizados para la tipificación de TAP por PCR-ARMS	53
Cuadro 7: Distribución de las frecuencias de los alelos de TAP1 y TAP2 en seris	60
Cuadro 8: Frecuencias haplotípicas de clase II en mestizos	63
Cuadro 9: Frecuencias haplotípicas en seris	64
Cuadro 10: Análisis estadístico de los haplotipos compartidos entre seris y mestizos	65
Cuadro 11: Análisis por aminoácidos entre seris y mestizos	66
Cuadro 12: Distribución de las frecuencias génicas de los genes TAP1 y TAP2 en diabetes tipo I	67
Cuadro 13: Distribución de las frecuencias génicas de los genes TAP1 y TAP2 en artritis reumatoide	68
Cuadro 14: Distribución de las frecuencias génicas de los genes TAP1 y TAP2 en cardiopatía reumática	69
Cuadro 16: Distribución de las frecuencias génicas de los genes TAP1 y TAP2 en síndrome de VKH	70
Cuadro 17: Análisis por aminoácidos en diabetes tipo I	73
Cuadro 17: Análisis por aminoácidos en artritis	74
Cuadro 18: Análisis por aminoácidos en cardiopatía reumática	75
Cuadro 20: Análisis por aminoácidos en VKH	76
Cuadro 20: Resumen de los hallazgos encontrados de TAP en población mexicana	77
Cuadro 21: Análisis para la presencia de Thr/665/TAP2 en DMDI y sanos, excluyendo al DRB1*0405 y al DQB1*0302	78
Cuadro 22: Cálculo del desequilibrio de enlace entre Tre665 y DRB1*0405 y DQB1*0302	79
Cuadro 23: Comparación de las frecuencias haplotípicas de Thr/665-DRB1*0405 y Thr/665-DQB1*0302 en DMDI y sanos	79

INDICE DE FIGURAS Y GRAFICAS

Figura 1: Mapa del Complejo Principal de Histocompatibilidad	12
Figura 2: Procesamiento antigénico para presentación en moléculas de clase I	20
Figura 4: Vías alternas de procesamiento antigénico para presentación en clase I	21
Figura 6: Posiciones dimórficas de TAP	23
Figura 7: Representación de las posiciones dimórficas de TAP en la proteína	24
Figura 8 : Tipificación de los genes TAP por PCR-ARMS	50
Gráfica 1: Distribución de las frecuencias génicas de los alelos TAP1 en mestizos y seris	61
Gráfica 2: Distribución de las frecuencias génicas de los alelos TAP2 en mestizos y seris	62
Gráfica 4: Distribución de las frecuencias génicas de TAP1 en autoinmunidad	71
Gráfica 5: Distribución de las frecuencias génicas de TAP2 en autoinmunidad	72

I. ABREVIATURAS

AR	Artritis reumatoide
ARMS	Sistema de amplificación refractaria por mutación
$\beta_2\mu$	Beta dos microglobulina
BiP	Proteína de unión a las inmunoglobulinas
CLIP	Péptido de la cadena invariante asociado a clase II
CP	Cadena pesada
CPA	Célula presentadora de antígeno
CRT	Calreticulina
CY	Citoplasmática
D	Desequilibrio de enlace
DMDI	Diabetes mellitus dependiente de insulina o tipo I
dNTP	Desoxinucleótidos trifosfato
FA	Frecuencia antigénica o alélica
FE	Fracción etiológica
FG	Frecuencia génica
FP	Fracción preventiva
HLA	Antígenos leucocitarios humanos
HSP	Proteínas de choque térmico
Ii	Cadena invariable
IL-2	Interleucina 2
INF- γ	Interferón gamma
LB	Loading buffer (amortiguador de corrimiento)
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
NOD	Ratones diabéticos no obesos
p	Significancia estadística
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RE	Reticulo endoplásmico
RRH	Riesgo relativo según Haldane
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TAE	Tris acetato EDTA
TAP	Transportadores de péptidos antigénicos.
Tc	Linfocito T citotóxico
TCR	Receptor de células T
Th	Linfocitos T cooperadores
TM	Transmembranal
VEB	Virus de Epstein Bar
VKH	Síndrome de Vogt Koyanagi Harada
χ^2	Chi cuadrada con corrección de Yates

II. RESUMEN

En este trabajo se describe por primera vez el perfil genético de los genes TAP en la población mexicana y su participación en algunas enfermedades autoinmunes. Dichos genes se localizan en la región de clase II del MHC, entre DM y DOB y su función es transportar péptidos de 7-13 aminoácidos hacia el retículo endoplásmico para asociarlos a las moléculas clase I. Dichos péptidos se generan en el citoplasma por degradación de proteínas endógenas en el proteasoma. Dada la participación de las moléculas TAP1 y TAP2 en el procesamiento antigénico, sus genes son candidatos importantes de susceptibilidad en algunas enfermedades. El objetivo del presente trabajo, fue investigar el polimorfismo de los genes TAP-1 y TAP-2 en la población mestiza mexicana, y una vez conocida su distribución en la población general, explorar su posible participación en algunas patologías de origen autoinmune. También se incluyó en el estudio una población indígena mexicana, los Seris, para conocer el polimorfismo existente en un grupo aislado. Las enfermedades incluidas fueron: diabetes mellitus tipo I, artritis reumatoide, síndrome de Vogt Koyanagi Harada y fiebre reumática. Los sujetos que se usaron para comparación son mestizos mexicanos de la zona del altiplano. La metodología empleada para la tipificación de los genes TAP es PCR-ARMS en la cual se incluyen cuatro iniciadores de los cuales dos contienen en su extremo 3' el nucleótido complementario a una de las variantes del nucleótido dimórfico a tipificar, los otros dos iniciadores reconocen dos secuencias que se encuentran a distancias asimétricas flanqueando a la posición dimórfica, de modo que las diferentes combinaciones de los iniciadores generarán fragmentos de distintos tamaños que permiten reconocer la variación nucleotídica presente. Los alelos más frecuentes en población mestiza son: TAP1A, TAP2A, TAP2B cuyas frecuencias antigénicas son 88.5, 78 y 53% respectivamente, en los Seris: TAP1A (95%), TAP1B (50%), TAP2A (67%), TAP2B (71%). En cuanto a las enfermedades estudiadas, el alelo TAP1D se encuentra significativamente disminuido en la diabetes mellitus dependiente de insulina ($p=0.003$), así como también el alelo TAP2B ($p=0.009$). Además en esta misma patología se observó que existe un mayor número de individuos homocigotos para treonina en la posición 665 de TAP2 con respecto a los controles

($p=0.005$), se efectuó el análisis de desequilibrio de enlace de la Thr/665 con los alelos diabetogénicos reportados para mexicanos: DRB1*0405 y el DQB1*0302, los resultados muestran que la Thr/665 es un factor independiente de susceptibilidad a la DMDI. La baja frecuencia de Thr/665 en seris y la ausencia de DMDI en ellos apoya la propuesta de la Thr/665 como factor de susceptibilidad asociado a DMDI

III. INTRODUCCIÓN

1. EL COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD

El MHC en el humano se conoce como Complejo HLA (del inglés: Human Leucocyte Antigens), se localiza en el brazo corto del cromosoma 6 y abarca aproximadamente 4,000 Kb. Se han descrito alrededor de 50 genes HLA que están incluidos en tres regiones denominadas clase I, clase II y clase III. La región de clase I tiene una longitud aproximada de 1,500 Kb, mientras que la de clase II abarca 1,000 Kb. La región de clase III contiene a los genes que codifican para la síntesis de los componentes del complemento C2, C4A, C4B de la vía clásica y Bf de la vía alterna; los genes Cyp21A y 21B de los cuales depende la síntesis de la 21-hidroxilasa; los genes para el factor de necrosis tumoral TNF- α y TNF- β ; y el gen que codifica para la proteína de choque térmico de 70 KDa (HSP-70)^{1,2}.

A. ESTRUCTURA DE LOS ANTÍGENOS DE CLASE I

Las moléculas clase I están formadas por una glicoproteína de 45 KDa llamada cadena pesada o α unida no covalentemente a una cadena ligera de 12 KDa llamada β_2 -microglobulina (β_2 -m). La cadena α tiene 3 dominios: α -1, α -2 y α -3, una región transmembranal TM y una región citoplásmica CY. La región de unión al péptido se encuentra en los dominios α -1 y α -2, que forman la porción superior de la molécula clase I, donde radica todo el polimorfismo. El dominio α -3 y la β_2 -m forman parte de la porción extracelular de la molécula y tienen una estructura muy similar a la de la región constante de la cadena pesada de las inmunoglobulinas. Se sabe que las moléculas MHC pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas, cuyos genes evolucionaron del mismo gen ancestral, lo mismo que los genes clase II, los del receptor de las células T (TCR), los de las moléculas CD2, CD3, CD4, CD8 y el gen de la molécula de adhesión neural (N-CAM). Los dominios de unión al péptido no pertenecen a esta familia, pero

su estructura secundaria tiene homología con la HSP-70^{1,2}. La región de clase I está formada por 17 genes, de los cuales sólo se transcriben 6 productos, pues los demás son pseudogenes. Los genes de clase I codifican para la síntesis de los antígenos clásicos HLA-A, B y C, que juegan un papel central en la unión y presentación de péptidos a los linfocitos T citotóxicos. Los productos de los genes de clase I son muy polimórficos, se encuentran ampliamente distribuidos en todas las células nucleadas y se expresan sobre la membrana celular, pero su densidad es particularmente elevada en los linfocitos T y B. Existen otros genes clase I llamados no clásicos que gobiernan la síntesis de antígenos de diferenciación, entre los cuales están lo que se describen a continuación: la molécula HLA-G se expresa sobre membranas del trofoblasto y en la interfase materno-fetal. Las HLA-E y F son intracelulares. Los genes clase I no clásicos difieren de los clásicos en que no son polimórficos y se expresan en el período embrionario e intervienen en la maduración y el mantenimiento intrauterino del feto. Los genes HLA-X y H se transcriben pero no son funcionales^{1,2}. En la Figura 1, se esquematizan las regiones del MHC.

B. FUNCIÓN DE LAS MOLÉCULAS DE CLASE I

La cristalografía de las moléculas clase I permitió un mejor entendimiento de su función¹². Inmediatamente se reconoció la importancia del sitio de unión al péptido, localizado en los dominios α -1 y α -2, así como el significado de la interacción de la molécula clase I cargada con el péptido con el TCR. Los péptidos que se unen a las moléculas clase I se generan por degradación del antígeno que se halla en el citosol de la célula presentadora de antígeno (CPA). El proceso ocurre a través de la vía proteolítica, mediada por el proteasoma. Estos son complejos proteicos multicatenarios que contienen 15 a 20 subunidades, dos de las cuales se encuentran codificadas en la región de clase II del MHC cuyos genes se denominan LMP2 y LMP7. El proteasoma funciona sin estas dos subunidades, pero cuando se incluyen al complejo originan péptidos de un tamaño y especificidad adecuados para asociarse con las moléculas clase I. Estos péptidos son transportados al retículo endoplásmico mediante transportadores de péptidos antigénicos (TAP), que son heterodímeros codificados por los genes TAP1 y TAP2, también ubicados en clase II, una vez en el retículo endoplásmico se unen inmediatamente a las moléculas de clase I para formar el complejo clase I-péptido, que se exporta a la superficie celular para ser presentado al TCR de la célula precursora T citotóxica (Tc), cuya unión induce la expresión del receptor de IL-2 del linfocito T, que al asociarse a IL-2 activa a la célula que prolifera y se

diferencia a Tc madura, la cual mata selectivamente a las células que expresan el complejo clase I-péptido. La molécula clase I que no se carga con un péptido se dirige a un subcompartimiento del retículo endoplásmico para su degradación. La mayoría de los péptidos que se unen a clase I derivan de las proteínas endógenas y tienen un tamaño de 8 a 10 residuos de aminoácidos³. Actualmente existen 186 alelos para el locus B, 83 para el locus A, 42 para C, 5 para E y 7 para G⁴, pero cada día se identifican algunos más.

C. ESTRUCTURA DE LOS ANTÍGENOS DE CLASE II.

La región HLA-D se conoce como región de clase II y abarca aproximadamente 1,000 KB con la subregión DP en el extremo centromérico, la subregión DR se halla en el extremo telomérico y la de DQ en el centro. El locus DR está formado por 10 loci, el DRA que es poco polimórfico y hay 9 loci DRB, de los cuales del DRB1 al DRB9, sólo los loci DRB1, 3, 4 y 5 se expresan y los demás son pseudogenes. En DQ hay 4 loci, DQA1, DQA2, DQB1 y DQB2, de los cuales sólo se expresan DQA1 y DQB1. En la región DP hay dos genes DPA1 y DPB1 y dos pseudogenes DPA2 y DPB2. Además también se hallan los genes DNA, DMA, DMB, LMP2, LMP7, TAP1, TAP2 y DOB⁵. En la Figura 1, se esquematizan todos estos loci.

Las moléculas clase II son codificadas por dos genes, uno para la cadena α y el otro para la cadena β y el producto de ambos genes forman una glicoproteína heterodimérica que se encuentra unida a la membrana plasmática. La cadena α , o cadena pesada, tiene 33-35 KDa y la cadena β , o ligera, es de 27-29 KDa y se encuentran unidas en forma no covalente. La cadena α tiene dos dominios α -1 y α -2, una región transmembranal (TM) y una citoplasmática (CY). La cadena β está compuesta por los dominios β -1 y β -2, la región TM y la CY. El péptido se une a los dominios α -1 y β -1, que se encuentran en la porción más externa de la molécula clase II, formando el nicho de unión. La mayor parte del polimorfismo de las moléculas de clase II se encuentra concentrado en el dominio β -1, aunque en DQ también hay variabilidad en el dominio α -1 y también en DP α aunque en menor proporción. Los dominios α -2 y β -2 tienen una estructura bastante similar a la de las inmunoglobulinas perteneciendo a esta superfamilia.⁶

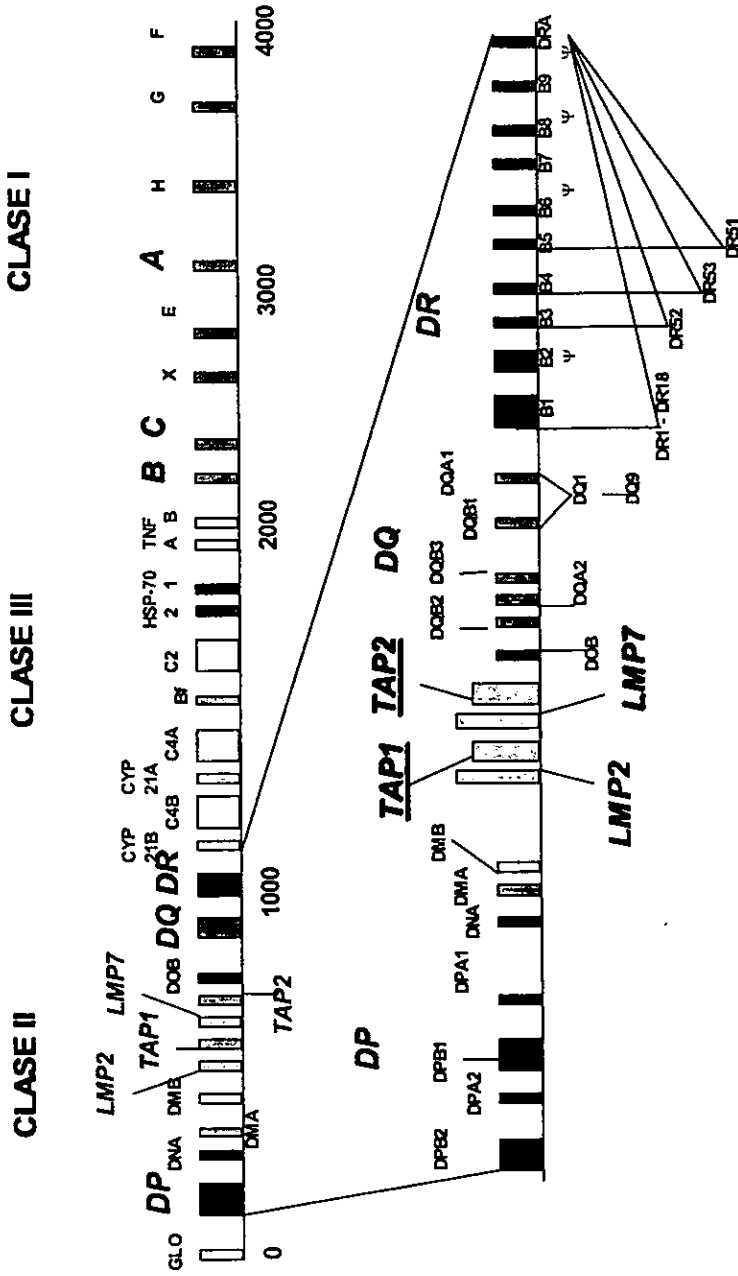
D. FUNCIÓN DE LAS MOLÉCULAS DE CLASE II

Las moléculas clase II, cuya cristalografía se dio a conocer en 1993⁷, unen péptidos generados por la degradación de proteínas en la vía endocítica, en donde las moléculas exógenas son endocitadas por las CPA en forma directa o por endocitosis mediada por receptores, tales como los FcR (para complejos inmunes) o por inmunoglobulinas de superficie en los linfocitos B, las vesículas endocíticas iniciales o endosomas tempranos, se fusionan en vesículas más grandes, que van acidificando su contenido y modificando la composición enzimática del mismo. Aquí comienza la degradación parcial de los Ag endocitados, en péptidos más pequeños. Hay enzimas que reducen enlaces disulfuro, y numerosas proteasas, tales como catepsinas B, D y E. Los endosomas más maduros o tardíos, finalmente se fusionan con lisosomas.⁸ La catepsina A y B de los lisosomas son las proteasas generadoras de péptidos. El complejo clase II-péptido se forma en el compartimento prelisosomal, en donde se acumulan las moléculas clase II recién sintetizadas, cuyas cadenas α y β se ensamblan en el retículo endoplásmico ayudadas por la calnexina asociándose inmediatamente con la cadena Invariable (Ii), la que evita que el sitio de unión al péptido se ocupe, esta cadena pesa 33 KDa y su gen se encuentra localizado en el cromosoma 5.

El sitio de unión al péptido tiene una considerable variación alélica y acomoda péptidos de 13-25 residuos de aminoácidos⁹. Tres heterodímeros clase II se asocian para formar un complejo nonamérico con el trímero de la cadena Ii, dirigiéndose así a la vía endocítica. La mayoría de las cadenas Ii son eliminadas por proteólisis, dependiente de catepsina B y D.

Las moléculas HLA-DM, que también se acumulan en los compartimentos ricos en clase II, catalizan la remoción dependiente de pH bajo del péptido llamado CLIP (del inglés: CLass II associated Invariant Peptide), que cubre el sitio de unión a péptidos de clase II y que deriva del corte de la cadena Ii. Este pequeño péptido mantiene a las moléculas clase II en una conformación relativamente inestable, receptiva para los péptidos antigénicos, los cuales al unirse a clase II pueden inducir un cambio conformacional para que adquieran una conformación altamente estable. El mecanismo por el cual las moléculas clase II son liberadas del compartimento pre-lisosómico para la expresión en la superficie no está completamente claro. Los hallazgos de microscopía electrónica sugieren que, en algunos casos, el compartimento que lleva a las moléculas clase II puede fusionarse con la superficie celular, dejando ahí a las moléculas ocupadas con péptidos^{3, 10}.

Figura 1: Mapa del Complejo Principal de Histocompatibilidad



Tomado de Trowsdale y Col, 1997¹¹.

La activación del linfocito T resulta en una respuesta Th1 si el complejo MHC-peptido interacciona fuertemente con el receptor del linfocito T, mientras que se favorece una respuesta Th2 si la interacción es débil¹².

Existe un reciclaje de moléculas MHC-II desde la membrana, las cuales pueden ser internalizadas pasando directamente a los endosomas tempranos. Los complejos MHC-II-peptidos de alta afinidad, no son fácilmente disociables, ya sea en la membrana como dentro de los endosomas. Sin embargo una fracción de moléculas MHC-II ocupadas con péptidos de baja afinidad, con la cadena invariable o con el fragmento CLIP, pueden intercambiar con otros péptidos después de la internalización. El compartimento para esta nueva carga de moléculas recicladas es probablemente distinto de aquél al que son transportadas las moléculas sintetizadas *de novo*. En experimentos con el antígeno H3 del virus de la influenza y con la proteína básica de la mielina se demostró que las moléculas requerían del reciclaje para su presentación, mientras que no era así para el antígeno M1 de la matriz del mismo virus. Al parecer el reciclaje de las moléculas MHC-II pudiera ser de utilidad para la presentación de antígenos que son rápidamente degradados al ser endocitados por las células presentadoras de antígeno¹³. Se ha sugerido que el reciclaje directo de la membrana de complejos MHC-II-Ii no conduce tan rápidamente a proteólisis de la cadena Ii y es necesario el paso subsecuente a endosomas más tardíos¹⁴.

E. VÍAS ALTERNAS DE PROCESAMIENTO ANTIGÉNICO

Además de la vía citosólica para la presentación de antígenos exógenos hay evidencias de la existencia de vías no citosólicas para su presentación en moléculas clase I por los macrófagos. La presentación de ovoalbúmina asociada a bacterias (en forma de una proteína de fusión) por clase I, no es inhibida por brefeldina A (antibiótico que inhibe la migración del RER al Golgi), sugiriendo una vía no citosólica de presentación. Otro ejemplo es la presentación de antígenos virales asociados con "detritus" celulares. La presentación de estos antígenos tampoco se inhibe por brefeldina, ni por una mutación en el transportador TAP. Se piensa que en estos casos los péptidos son generados por proteólisis en el compartimento endocítico, aunque, no está completamente resuelto si estos péptidos se unen a las moléculas clase I. También se ha observado que los péptidos pueden unirse a clase I dentro de vesículas, ya que el péptido (SIINFEKL) de ovoalbúmina es presentado por clase I cuando es conducido a los fagosomas

sobre un soporte inerte. Estos datos implican que las moléculas clase I viajan dentro de compartimentos vesiculares¹⁵.

En general, las moléculas clase I no se hallan en las vesículas endocíticas de la mayoría de las células, pero pueden entrar a este compartimento en los fagocitos por diferentes vías. Algunos estudios indican que las moléculas de la superficie celular se introducen en los fagosomas y son internalizadas de la membrana plasmática durante la fagocitosis, sugiriendo que las moléculas clase I recién sintetizadas también pueden ser transportadas a esas vesículas. Además, en los macrófagos pueden reciclarse constitutivamente entre la superficie celular y el compartimento endocítico. La endocitosis de estas moléculas ocurre también en las células T y esto debe considerarse para algunos ejemplos de presentación de antígenos exógenos. Finalmente, la cadena invariable, comúnmente usada en el transporte de clase II, puede asociarse con algunas moléculas clase I recién sintetizadas y dirigir su transporte dentro de las vesículas endocíticas. En todos estos casos, la mayoría de las clase I que entran en el compartimento endocítico probablemente ya están ocupadas con péptidos. No obstante, es posible que haya suficiente número de moléculas vacías para unir péptidos o que el bajo pH en las vesículas pueda disociarlos y generar moléculas vacías¹⁵.

Los estudios iniciales que demostraron que los fagocitos podían presentar antígenos exógenos sobre moléculas clase I se llevaron a cabo *in vitro* y la pregunta clave fue si esta vía podía operar bajo condiciones fisiológicas. La relevancia de la vía *in vivo* se demostró con la inyección de ovoalbúmina soluble en ratones que resultaba en su presentación por clase I por los macrófagos. También se encontró que los mismos antígenos particulados presentados por fagocitos *in vitro* estimulan respuestas de T_c cuando se inyectan *in vivo*.¹⁵ Líneas celulares de linfocitos B humanos que presentan mutaciones en los genes TAP no son reconocidas por clonas de linfocitos T dirigidas contra el HLA-DR allogénico, y la restauración de la expresión por transfección de cDNA de los genes TAP, resulta en el reconocimiento allogénico de HLA-DR por clonas de T¹⁶. Recientemente se ha informado que las moléculas de clase II pueden unir péptidos en el RE, inhibiendo su asociación con la cadena invariable, y así unir péptidos de proteínas endógenas¹⁶. Muchas partículas diferentes como bacterias, microesferas de látex, hierro o sílica, pueden ser presentadas en el contexto de las moléculas de clase I. La inmunización con HSP derivadas de tumores, estimulan la respuesta específica por parte de T_c por péptidos provenientes de antígenos tumorales que están unidos a las proteínas HSP presentes en las CPAs. El concepto

de que las moléculas de clase I se encuentran involucradas exclusivamente en la presentación de antígenos sintetizados endógenamente, debe ser modificado. Se ha descrito la transferencia de pequeños péptidos del lisosoma al citoplasma, así como también el paso de proteínas en la dirección contraria. También se propone que algunas vesículas endocíticas pueden simplemente romperse liberando su contenido hacia el citosol. La cadena invariante puede asociarse con algunas moléculas clase I, y dirigir su transporte al interior de vesículas endocíticas¹⁷.

2. MOLÉCULAS TAP

A. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN

Dentro de la región MHC clase II entre la región DM y DOB, se encuentran 2 genes TAP1 y TAP2, que codifican para sus correspondientes proteínas TAP (Transporter in Antigen Processing), que son transportadores transmembranales dependientes de ATP. Forman un heterodímero presente en la membrana del RE cuyas cadenas poseen ambos extremos terminal N y C del lado citosólico. Dichas proteínas pertenecen a la superfamilia llamada transportadores ABC (por poseer *un ATP-binding cassette*), de más de 70 miembros. Estos se hallan en procariotes y eucariotes, y se encargan de transportar iones, aminoácidos, azúcares y péptidos⁸. La familia de transportadores ABC, incluye 30 miembros cada uno específico para un sustrato diferente, entre los que se encuentran, azúcares, iones inorgánicos, aminoácidos, péptidos y proteínas¹⁸.

Su función es transportar los péptidos provenientes de la degradación de proteínas en el citosol, dentro de la cual participa una proteasa multicatalítica o proteasoma, que es un complejo multimérico de más de doce componentes y de 700 kDa. Previo a su catabolismo, las proteínas citosólicas son modificadas mediante el agregado de una o más copias del polipéptido ubiquitina, que facilita su reconocimiento por los sistemas de degradación. Una vez que estas proteínas han sido modificadas son degradadas principalmente por proteasomas. Al menos dos de los componentes del proteasoma están codificados por genes ubicados dentro del sistema HLA, LMP-2 y LMP-7, los cuales se expresan por inducción del interferón γ , y reemplazan a las subunidades β que se expresan constitutivamente. Esta sustitución genera ahora péptidos con las características requeridas para su transporte por las moléculas TAP¹⁹. Los péptidos que se

generan en el citosol son translocados al interior del RER por las moléculas TAP que transportan eficientemente péptidos de 6-15 residuos de largo y con mucha menor eficiencia péptidos más largos. Además, los transportadores pre-seleccionan péptidos con determinados residuos en su extremo carboxilo-terminal. Así, en humanos, los mejor transportados poseen residuos básicos o hidrofóbicos en dicho extremo²⁰. Se han descubierto varias proteínas que participan en el plegamiento y conformación tridimensional de las proteínas y una de sus funciones principales es evitar la agregación de proteínas desdobladas que son recién sintetizadas. Estas interacciones se incrementan cuando las células se someten a distintos tipos de estrés (limitación de glucosa, altas temperaturas, etc.). Esta familia de proteínas inducidas por el estrés se llaman proteínas de choque térmico (HSP) o chaperonas²¹ y juegan un papel esencial en la corrección de proteínas desdobladas o parcialmente dobladas, e intervienen en la estabilización de polipéptidos translocados al ER y en la dispersión de agregados de proteínas y péptidos²². Los péptidos citosólicos son acarreados hasta los TAP por la HSP 70⁸. Recientemente se ha demostrado en líneas humanas de células B que son TAP negativas, complejos de moléculas de clase I asociadas con dos moléculas adicionales: una chaperona residente del RE que une calcio "Calreticulina" (CRT), y una nueva glicoproteína de 48 kDa llamada tapasina²³.

Cuando se sintetiza la cadena pesada de la molécula clase I, se une rápidamente a la calnexina vía interacciones con glicanos inmaduros y con residuos del dominio transmembranal de la cadena pesada (CP); la β_2 microglobulina ($\beta_2\mu$) desplaza a la calnexina y este nuevo dímero CP- $\beta_2\mu$ se une instantáneamente a una chaperona homóloga del RE, llamada calreticulina (CRT). Aunque la calnexina no es esencial para el ensamble de CP- $\beta_2\mu$, ésta puede servir para incrementar la eficiencia del ensamblaje directamente o simplemente por retención de las moléculas clase I vacías en los compartimentos secretorios tempranos. La tapasina es esencial para la interacción entre clase I y TAP pues su ausencia resulta en la incapacidad de asociación de algunos alelos MHC clase I con TAP. El gen que codifica para la tapasina probablemente se encuentra entre la región 6p11 y 6pter del cromosoma 6. La tapasina probablemente se une al complejo calreticulina-clase I mediante la interacción directa con clase I pues los anticuerpos anticalreticulina co-precipitan TAP sólo en células que expresan CP y la $\beta_2\mu$. Las moléculas clase I se asocian a TAP ya sea mediante la unión a tapasina o bien interactuando directamente con ambas tapasina y TAP. La tapasina puede unir péptidos liberados por TAP en el RE y pasarlos a las moléculas de clase I. Es posible que la CP se asocia simultáneamente no sólo con -

$\beta_2\mu$ y péptido sino también con, CRT, tapasina y TAP. Parece que cada uno de estos contactos es esencial para mantener la estabilidad del complejo. La unión del péptido a la molécula clase I ocasiona el desensamblaje del complejo CRT-clase I del complejo TAP-tapasina seguido por la liberación de clase I de la calreticulina; este desensamblaje se debe probablemente a un cambio conformacional en el heterodímero TAP que se genera por la hidrólisis de ATP. Otra posibilidad es que el péptido induzca un cambio conformacional en la molécula de clase I ocasionando la disociación del complejo. Cuando TAP no está presente o cuando el suministro de péptidos esta limitado, clase I se degrada en el RE; si se carga con un péptido, se libera del complejo CRT-TAP-tapasina.²⁴ En la Figura 2 se muestra el procesamiento antigénico para presentación en moléculas clase I. En células que tienen alteraciones en el procesamiento antigénico, muchas moléculas de clase I son degradadas antes de su tránsito por el Golgi. Algunas moléculas clase I vacías llegan a la superficie celular, donde pueden asociarse con péptidos exógenos, adquiriendo una conformación estable. Si esto no ocurre, se degradan rápidamente como resultado del reciclamiento endocítico. En el ensamble de las moléculas clase I con los péptidos, hay varios pasos de control de calidad para asegurar el plegamiento apropiado y la asociación correcta con el péptido. La calnexina asegura que la cadena α se una a la β_2 -microglobulina, si esto falla la cadena pesada es degradada probablemente por unión con BiP (proteína de unión a las inmunoglobulinas) cuya función se describe más adelante. Una vez que se forma el heterodímero, éste se puede unir a TAP para recibir al péptido y ser exportado a la superficie celular. La asociación a TAP y la unión al péptido, ocurren en un espacio muy estrecho del RE en donde si el heterodímero no se asocia inmediatamente a TAP, o une a un péptido inapropiado, se recicla para que la molécula tenga una segunda oportunidad de captar al péptido adecuado. Finalmente si no capta ningún péptido, es enviado a un subcompartimento de degradación en el RE donde se localizan enzimas marcadoras con ubiquitina.

Las moléculas de clase I también pueden presentar péptidos generados por "peptidasas de señal" presentes en el RE que es la vía de degradación del RE. También en las moléculas de clase I se pueden presentar proteínas provenientes de endosomas. Con esta vía se relaciona directamente el proceso de la macropinocitosis, en el cual se libera material extracelular dentro de la célula, aparentemente por disolución de las vesículas macropinocíticas. Hay HSPs citoplasmáticas, que promueven la translocación de proteínas citosólicas con secuencias señal particulares al interior del endosoma, en donde pueden seguir la ruta de las proteínas exógenas

para ser presentadas por clase II²⁵. La BiP es una proteína del lumen del RE que pertenece a la familia de las HSP y juega un papel muy importante en el proceso de doblamiento de las proteínas sintetizadas en el RE. Se han propuesto algunas funciones para BiP, que incluyen: a) que capture los péptidos translocados a través del RE, reteniéndolos hasta su unión con clase I, b) Puede estar involucrada en la protección contra la degradación de los péptidos transportados, o bien, puede presentar aquellos péptidos que no tengan las características requeridas para su unión a clase I a las proteasas del RE; c) BiP puede funcionar como un "cesto de basura", capturando los péptidos que no se unieron a clase I²⁶. Hoy es evidente que las mutaciones en los genes TAP alteran la presentación antigénica por clase I, pues al transfectar con dichos genes a células que carecen de ellos, se restaura la presentación antigénica²⁷. Algunos virus evaden la respuesta inmunológica, al alterar el procesamiento antigénico, sintetizando proteínas tempranas como la ICP47 del virus del Herpes Simple, la cual interacciona con TAP evitando así la translocación de péptidos al interior del RE para ser unidos a las moléculas de clase I^{28,29}; el citomegalovirus también presenta un mecanismo de evasión a nivel de TAP debido a la expresión de la proteína US6, que bloquea a TAP desde el lado luminal del retículo endoplásmico¹⁹.

Más aún, la presencia del péptido es crucial para lograr el plegamiento correcto y la estabilidad de las proteínas clase I. Las células mutantes en los genes TAP, poseen una expresión reducida de moléculas de clase I en la superficie celular. En ausencia de péptidos, los dímeros $\alpha\beta\mu$ son muy inestables y son enviados al Golgi; donde se degradan, pero una pequeña proporción de ellos podría alcanzar la superficie celular, donde, a temperaturas fisiológicas, tienen una vida media muy corta. En algunos modelos experimentales, el agregado directo de péptidos a una célula permite su reconocimiento por linfocitos Tc. Probablemente el pequeño número de clase I "desnudas" que llega a la superficie celular es responsable de captar péptidos directamente del exterior. Una vez que una molécula se asocia a un péptido, el trimero migra a través del Golgi hacia la superficie celular, para su presentación a linfocitos Tc. Dicha migración se puede inhibir por el antibiótico brefeldina A⁸.

En la Figura 3 se muestran las vías alternas de presentación mediada por clase I. La expresión de los genes LMP y los genes TAP es inducible con INF- γ (al igual que los genes de clase I y clase II), lo que sugiere que se requiere de una regulación coordinada de los mismos para que la presentación antigénica sea eficiente. La transformación maligna de células humanas se asocia muy estrechamente con la pérdida de expresión de moléculas clase I, debida a la baja

expresión de TAP. Las células que tienen una expresión disminuida de clase I pueden escapar al reconocimiento de los Tc, y se ha demostrado *In vitro* que hay una marcada reducción en la susceptibilidad a la lisis específica contra tumores³⁰.

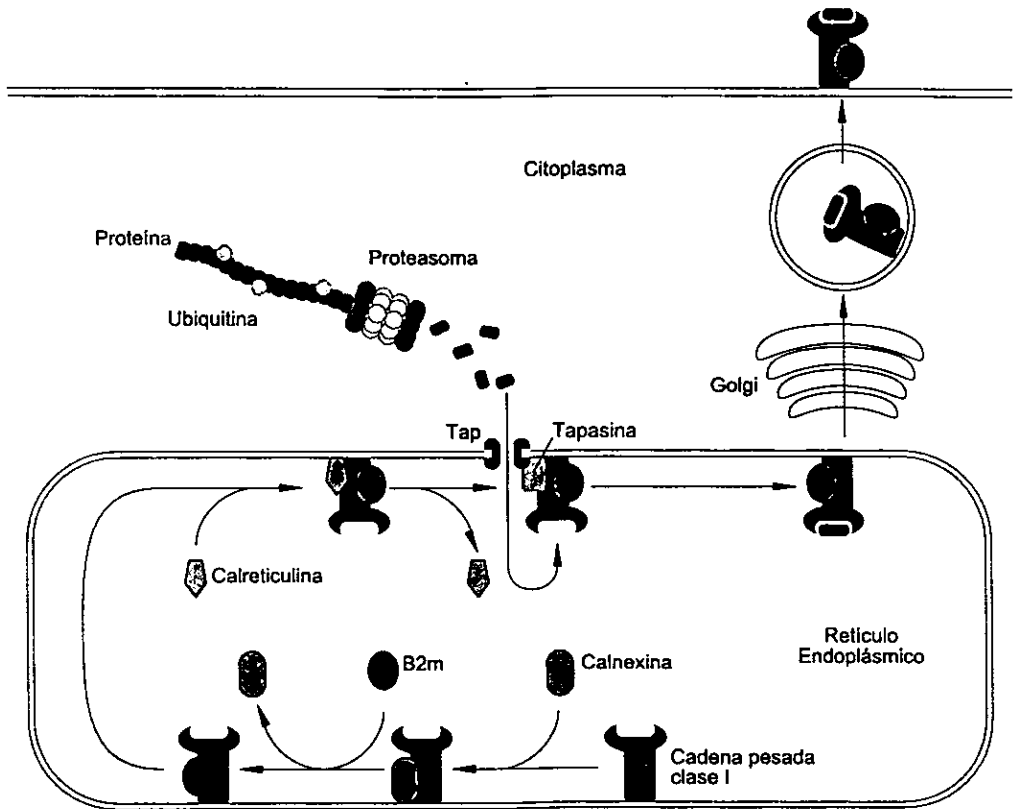
B. POLIMORFISMO DE LOS GENES TAP

El análisis de las secuencias de las moléculas TAP, muestra que los genes TAP tienen cierto grado de diversidad, que en el caso de TAP1 está localizado principalmente en dos posiciones polimórficas correspondiendo a cambios del codón 333 (ATC/GTC-Ile/Val) y en el codón 637 (GAC/GGC-Asp/Gly). Se han descrito cinco sustituciones polimórficas en los alelos del locus de TAP2, las cuales codifican para cambios de aminoácidos en las posiciones 379 (GTA/ATA-Val/Ile), 565 (GCT/ACT-Ala/Thr), 665 (ACA/GCA-Thr/Ala), 687 (TAG/CAG-Stop/Gln)⁴⁸ y una sustitución silenciosa en el nucleótido 2091. Las sustituciones de los aminoácidos 665 y 687 con el nucleótido 2091 se encuentran sólo en dos combinaciones: Thr-665, Stop-687, G-2091 y Ala-665, Gln-687, T-2091, por lo que únicamente se tipifica la posición 665 ya que las otras dos posiciones polimórficas se encuentran en desequilibrio de ligamiento con la sustitución en el codón 665. El aminoácido de la posición 379 se localiza en la región transmembranal hidrofóbica de la proteína TAP2, mientras las posiciones 565 y 665 se localizan en el sitio de unión del ATP³¹. Existen entonces 4 alelos para el gen TAP1 que son: A, B, C y D y 8 alelos para el gen TAP2: A, B, C, D, E, F, G y H. El alelo TAP1D sólo se había calculado matemáticamente³², pues es un alelo extremadamente raro³³. En ratas se ha observado que el polimorfismo de TAP es muy extenso, principalmente en la región membranal y la diversidad influye directamente sobre la selección de secuencias de los péptidos que se van a transportar³⁴. En la Figura 4 se indican las posiciones de los residuos descritos.

C. NOMENCLATURA

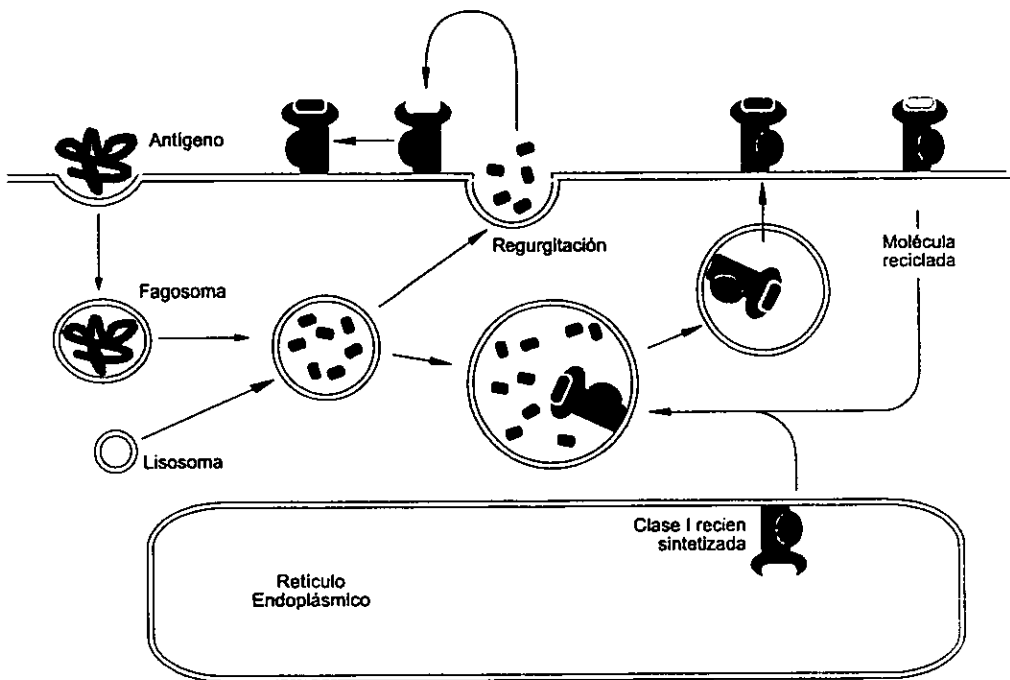
La nomenclatura de las moléculas TAP se basa en las combinaciones alélicas del dimorfismo de TAP, descrito en la Figura 4. Se ha creado una enorme confusión en la nomenclatura por varias razones ya que diferentes laboratorios han usado nombres distintos para la misma combinación de dimorfismo.

Figura 2: Procesamiento antigénico para presentación en moléculas de clase I



²⁴Tomado de Elliot T y Col, 1997.

Figura 3: Vías alternas de procesamiento antigénico para presentación en clase I



²⁴Tomado de Elliot T y Col, 1997

Además los nuevos polimorfismos que se han ido describiendo, aún no se han integrado en este esquema, hasta que se reúna nuevamente el comité de nomenclatura oficial en el próximo taller internacional de histocompatibilidad para el año 2001.

Las técnicas de tipificación actuales entre las que se encuentra la PCR-ARMS no permiten la asignación inequívoca de los alelos en los individuos que son heterocigotos a más de una posición dimórfica. Por ejemplo, en el caso de TAP1, un individuo heterocigoto que es Ile/Val-333, Asp/Gly-637 puede ser según la nomenclatura TAP1A/B o TAP1C/D. Debido a esta limitación el Comité Oficial de nomenclatura para HLA ha sugerido que los resultados sean expresados en ambos términos: de dimorfismo de aminoácidos individuales y como definición específica de alelo (cuando esto sea posible). Dicho comité ha comenzado a nombrar los alelos de TAP usando una terminología similar a la que se emplea para los alelos de clase I y clase II, lo cual permitirá aclarar la confusión en torno a este tema. Por otro lado, la metodología actual de tipificación para TAP, se basa predominantemente en la tipificación del dimorfismo de los nucleótidos los cuales representan los cambios en los aminoácidos. Sin embargo la nomenclatura de dicho comité se basa en la secuencia nucleotídica. No existe nomenclatura de WHO para el alelo TAP2C, ya que la existencia de éste se ha deducido por tipificación de residuos polimórficos específicos y no por secuenciación.³⁵ En el Cuadro 1 y en el Cuadro 2 se enlista la nomenclatura en las dos formas mencionadas para TAP1 y para TAP2, respectivamente.

3. ASPECTOS CLÍNICOS E INMUNOGENÉTICOS DE LOS PADECIMIENTOS INCLUIDOS EN EL ESTUDIO.

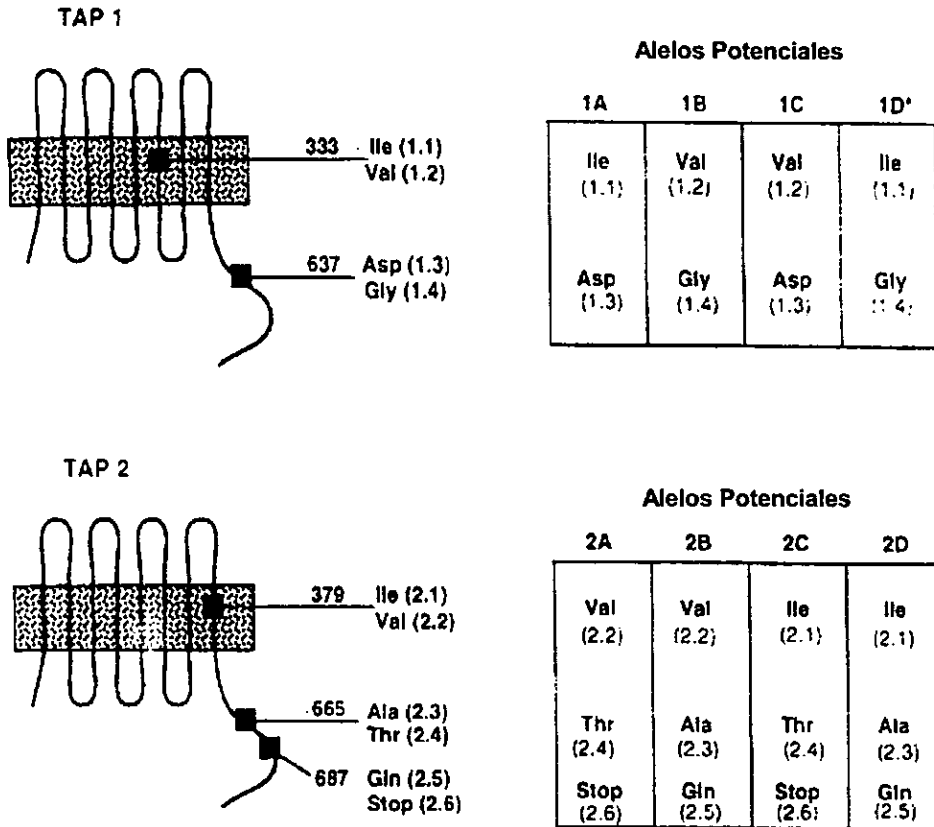
A. MHC Y AUTOINMUNIDAD

La capacidad de las moléculas HLA y la propiedad de unir fragmentos de péptidos y presentarlos a los receptores de las células T determinan el fenotipo de la respuesta inmunológica contra un gran número de antígenos y son funciones que explican el papel primordial que juegan las moléculas HLA en la respuesta celular. En consecuencia, la susceptibilidad y/o protección a casi todas las enfermedades autoinmunes está bajo el control parcial de genes codificados dentro del MHC.

Figura 4: Posiciones dimórficas de TAP³⁶

Locus TAP1		Nomenclatura ALELOS		
333	637			
ILE	ASP		TAP1A	
VAL	GLY		TAP1B	
VAL	ASP		TAP1C	
ILE	GLY		TAP1D	
Locus TAP2				
379	565	665	687	
VAL	ALA	THR	STOP	TAP2A
VAL	ALA	ALA	GLN	TAP2B
ILE	ALA	THR	STOP	TAP2C
ILE	THR	THR	STOP	TAP2D
VAL	THR	THR	STOP	TAP2E
ILE	THR	ALA	GLN	TAP2F
VAL	THR	ALA	GLN	TAP2G
ILE	ALA	ALA	GLN	TAP2H

Figura 5: Representación de las posiciones dimórficas de TAP en la proteína



Tomado de Karyl S. Barron (77)

Cuadro 1 : Nomenclatura oficial de los alelos TAP1

		CODON					
SECUENCIA	ALELO	333	370	458	637	648	661
TAP1*0101	TAPIA	<u>A</u> T <u>C</u> Ile	<u>G</u> <u>C</u> <u>T</u> Ala	<u>G</u> <u>T</u> <u>G</u> Val	<u>G</u> <u>A</u> <u>C</u> Asp	<u>C</u> <u>G</u> <u>A</u> Arg	<u>C</u> <u>C</u> <u>G</u> Pro
TAP1*02011	TAPIB	<u>G</u> <u>T</u> <u>C</u> Val	<u>G</u> <u>C</u> <u>T</u> Ala	<u>G</u> <u>T</u> <u>G</u> Val	<u>G</u> <u>G</u> <u>C</u> Gly	<u>C</u> <u>G</u> <u>A</u> Arg	<u>C</u> <u>C</u> <u>G</u> Pro
TAP1*02012	TAPIB	<u>G</u> <u>T</u> <u>C</u> Val	<u>G</u> <u>C</u> <u>T</u> Ala	<u>G</u> <u>T</u> <u>G</u> Val	<u>G</u> <u>G</u> <u>C</u> Gly	<u>C</u> <u>G</u> <u>A</u> Arg	<u>C</u> <u>C</u> <u>A</u> Pro
TAP1*0301	TAPIC	<u>G</u> <u>T</u> <u>C</u> Val	<u>G</u> <u>C</u> <u>T</u> Ala	<u>G</u> <u>T</u> <u>G</u> Val	<u>G</u> <u>A</u> <u>C</u> Asp	<u>C</u> <u>G</u> <u>A</u> Arg	<u>C</u> <u>C</u> <u>G</u> Pro
TAP1*0401	TAPIB	<u>G</u> <u>T</u> <u>C</u> Val	<u>G</u> <u>C</u> <u>T</u> Ala	<u>T</u> <u>T</u> <u>G</u> Leu	<u>G</u> <u>G</u> <u>C</u> Gly	<u>C</u> <u>A</u> <u>A</u> Gln	<u>C</u> <u>C</u> <u>G</u> Pro
	TAPID	<u>A</u> <u>T</u> <u>C</u> Ile			<u>G</u> <u>G</u> <u>C</u> Gly		

Tomado de Teisserenc H y Col, 1997, (36)

Cuadro 2: Nomenclatura oficial de los alelos de TAP2

		CODON									
SECUENCIA	ALELO	163	379	386	387	436	565	604	651	665	687
TAP2*0101	TAP2A	GTC Val	GTA Val	GGG Gly	GTG Val	AAC Asn	GCT Ala	GGG Gly	CGT Arg	ACA Thr	IAG Stop
TAP2*0102	TAP2E	GTT Val	GTA Val	GGI Gly	GTG Val	AAC Asn	ACT Thr	GGG Gly	CGT Arg	ACA Thr	IAG Stop
TAP2*0201	TAP2B	GTT Val	GTA Val	GGG Gly	GTG Val	AAI Asn	GCT Ala	GGG Gly	CGT Arg	GCA Ala	CAG Gln
	TAP2C		ATA Ile				GCT Ala			ACA Thr	IAG Stop
	TAP2D		ATA Ile				ACT Thr			ACA Thr	IAG Stop
	TAP2G		GTA Val				ACT Thr			GCA Ala	CAG Gln
	TAP2H		ATA Ile				GCT Ala			GCA Ala	CAG Gln

Tomado de Teisserenc H y Col, 1997, (36)

Los primeros estudios demostraron que muchas enfermedades en humanos se asocian en distintos grados a los alelos clase I, pero el avance en las técnicas de análisis del MHC ha demostrado que en enfermedades autoinmunes están fundamentalmente involucrados los alelos clase II ³⁷. Esta asociación es especialmente fuerte en el caso de enfermedades con una patogénesis autoinmune definitiva o probable, y en la mayoría de los casos la susceptibilidad se asocia con alelos individuales y en algunos casos la combinación de alelos de los distintos loci resulta en un haplotipo particular que puede ser determinante para la susceptibilidad. Los modelos experimentales para diabetes, esclerosis múltiple y lupus eritematoso diseminado, han sido muy valiosos pues se ha logrado identificar sustituciones de nucleótidos dentro de las secuencias de los genes clase II, que están muy asociadas con susceptibilidad o resistencia y los datos han permitido empezar a conocer los mecanismos de asociación en cada caso³⁷. A la fecha se han informado más de 40 asociaciones entre genotipos clase II y susceptibilidad a enfermedades diversas y en casi todas hay una fuerte evidencia de que el sistema inmunológico reacciona contra un autoantígeno particular³⁷. A continuación se describen brevemente los hallazgos publicados para cada una de las enfermedades autoinmunes incluidas en el presente trabajo.

B. DIABETES MELLITUS DEPENDIENTE DE INSULINA O TIPO I

La diabetes mellitus (DM) comprende un grupo de desórdenes genéticos y clínicamente heterogéneos en los que la intolerancia a la glucosa es común. Se distinguen tres tipos: DM dependiente de insulina (DMDI) o tipo I, DM no dependiente de insulina (DMNDI) o tipo II, y otros tipos de diabetes incluyendo la asociada con enfermedad pancreática, hormonal, inducida por fármacos o químicos, anormalidad en los receptores de insulina, y síndromes genéticos³⁸

La diabetes tipo I es una patología autoinmune en la que hay una insulinitis aguda con infiltración de linfocitos y macrófagos en los islotes de Langerhans del páncreas. Se ha confirmado mediante autopsia que las dos terceras partes de los diabéticos presentan la lesión dentro de los primeros 6 meses después de iniciados los síntomas. Los islotes en la DMDI son pocos y muchas veces más pequeños que lo normal, el peso total es menos de la tercera parte del peso de los islotes de sujetos sanos o de pacientes con DMNDI o tipo II. Las células beta secretoras de insulina están virtualmente ausentes y los islotes consisten casi completamente de células que secretan glucagon (alfa), somatostatina (delta), y péptido pancreático (PP o F). Los

anticuerpos dirigidos contra el citoplasma de células de los islotes (ICA-cyt) se hallan en el suero del 60-90% de los pacientes con diagnóstico reciente y muestran que sólo el 0.5% de los individuos sanos son portadores de ellos. Estos anticuerpos generalmente reaccionan con los cuatro tipos de células de los islotes: alfa, beta, delta, y contra las células secretoras del péptido pancreático, pero solamente se destruyen las células productoras de insulina. Dichos anticuerpos desaparecen 2 años después del diagnóstico de DMDI en el 85-95% de los pacientes. Los anticuerpos responsables de la destrucción de las células beta están dirigidos contra antígenos de superficie.^{39,40,41}

La DMDI se caracteriza clínicamente por un inicio abrupto de los síntomas, insulinopenia, utilización reducida de la glucosa e incremento en la secreción de glucagon. La diuresis progresiva causa deshidratación, sed y si la pérdida de glucosa es grande hay pérdida de peso a pesar de la polifagia. Cuando la tasa de excreción de glucosa es cercana a la de sobreproducción de glucosa hepática, la hiperglucemia alcanza un efecto meseta, con un valor de glucosa entre 17 a 28 mmol/l (300 a 500 mg/dl). La cetoacidosis diabética puede ser un evento inicial o subsecuente en DMDI y es precipitada por el estrés, otras enfermedades, o la omisión de la insulina. Las hormonas liberadas durante el estrés se oponen a la acción de la insulina, estimulando la liberación de glucagon. La hipovolemia, consecuenta a la diuresis, incrementa la secreción de glucagon, catecolaminas y otras hormonas de estrés y por la vía de la disminución del flujo renal, reduce la degradación del glucagon resultando en una marcada hiperglucagonemia, hiperglucemia, y cetoacidosis. Si la diuresis osmótica es prolongada hay una disminución en la tasa de filtración glomerular que eleva la glucosa plasmática, debido a que la producción de glucosa hepática no se abate. La hiperosmolaridad y la salida de agua de las células con pérdidas urinarias sustanciales de sodio, potasio y magnesio son un factor importante. Usualmente esta enfermedad ocurre en la juventud y por ello se llama diabetes juvenil, no obstante puede iniciar a cualquier edad. Aunque la destrucción de las células beta requiere de más de un año, los individuos con este tipo de diabetes son dependientes de la insulina durante toda su vida ^{39,40,41,38}

a) Antecedentes genéticos.

Los estudios en gemelos idénticos muestran que las tasas de concordancia para la DMDI están entre el 30-50%, y son más altas que para gemelos no idénticos. Si la enfermedad fuera

enteramente el resultado de factores genéticos se esperarían tasas de concordancia de 100%, sin embargo, la susceptibilidad genética representa un importante componente en su etiología. Es interesante que los hijos de padres con DMDI tienen mucho más riesgo de padecerla que los hijos de madres con DMDI; además los pacientes homocigotos para el HLA-DR3 presentan un desorden autoinmune primario y los homocigotos para el DR4 desarrollan la enfermedad después de la exposición a un factor primario ambiental con una respuesta autoinmune secundaria.⁴² Los heterocigotos HLA-DR3/DR4 tienen un riesgo excepcionalmente elevado, algunos de 20 a 40 veces más que la población general y más alto que para los homocigotos de cualquiera de estos loci⁴¹. Hoy se sabe de manera indudable que participan factores genéticos dentro del MHC y fuera del cromosoma 6 como responsables de la expresión de la enfermedad. El locus genético que contribuye mayormente reside en la región de clase II del complejo HLA. La presencia de un ácido aspártico en el residuo 57 de la cadena DQ beta (ASP 57+) confiere resistencia a la DMDI, mientras que la ausencia de este aminoácido (ASP 57-) está asociado con la susceptibilidad⁴³. Más adelante se propuso un modelo de susceptibilidad basado en la expresión de un heterodímero HLA-DQ ya sea en *cis* o en *trans*, consistente de una cadena DQ-alfa que contiene una arginina en el residuo 52, asociada con una cadena DQ-beta que no contenga Asp en la posición 57 (DQ-alfa-Arg52+/DQ-beta-Asp57-), pues la expresión de estos heterodímeros se encuentra fuertemente asociada a DMDI y el grado de susceptibilidad depende del número de heterodímeros expresados⁴⁴.

En mexicanos, Gorodezky y col. demostraron que los antígenos HLA clase II que contribuyen a la susceptibilidad en la DMDI son el DR3, DR4, DQ2 y DQ8, mientras que, el DR11, DR15, DQ5, DQ6, DQ7 confieren protección. A nivel molecular, los alelos asociados más intensamente son el DRB1*0405 y el DRB1*0301, DQA1*0301, DQA1*0501, DQB1*0302, y DQB1*0201, y los haplotipos diabétogénicos para la población mexicana son: DRB1*0301-DQA1*0501-DQB1*0201, y DRB1*0405-DQA1*301-DQB1*0302⁴⁵. En esta población, además se demostró que los haplotipos de protección son de contribución amerindia, mientras que los de susceptibilidad son de origen mediterráneo⁴⁵. En México-americanos con DMDI el análisis de los genes HLA-DQA1,-DQB1 también mostró asociación con el DQA1*0301 y el DQB1*0302. Además del haplotipo DQA1*0501-DQB1*0201 característico del DRB1*0301, se ha observado que la heterocigocidad de estos dos haplotipos DR3-DQA1*0501-DQB1*0201/DR4-DQA1*0301-DQB1*0302 confieren el mayor riesgo al

desarrollo de la enfermedad. Como es evidente, los estudios transraciales son importantes para investigar los mecanismos de asociación HLA a la DMDI, puesto que estas asociaciones son similares a las de población caucásica, es consistente con la hipótesis de que los alelos de susceptibilidad en estos pacientes México-americanos son de origen caucásico ⁴⁶.

b) Implicación de TAP en DMDI

Una característica común en los pacientes con enfermedades autoinmunes asociadas a HLA clase II, es la baja densidad de moléculas clase I sobre la superficie de sus linfocitos. Se ha observado que cuando se introducen los genes TAP2 o TAP1 a líneas celulares de linfocitos B de pacientes con DMDI hay una recuperación en la expresión de moléculas clase I en el 40 % de los casos, sugiriendo que hay disfunciones en los genes TAP que contribuyen tanto al defecto en la expresión de clase I como en la presentación de antígeno diabetogénico⁴⁷. En pacientes noruegos y finlandeses se ha observado que la presencia de treonina (Thr) en la posición 665 de la molécula TAP2 está en desequilibrio de enlace (Δ) con el haplotipo DR4-DQ8 y con el DR3-DQ2 fuertemente asociados con la DMDI, mientras que la presencia de alanina (Ala) en la posición 665 se encuentra en Δ con los haplotipos protectores DR1-DQ5 y DR13-DQ6 (DQB1*0603). Además hay un incremento de homocigotos para Thr/665 y una disminución en la homocigosidad de Ala/665⁴⁸. En finlandeses, en cambio, la presencia de Ile/Val(333) y Asp/Asp(637) en TAP1 confiere un riesgo alto para el desarrollo de DMDI, presentando una segregación independiente de los genes del locus HLA-DR⁴⁹. En población caucásica la mayoría de linfocitos que infiltran el páncreas son CD8⁺ y además hay un incremento en la expresión de clase I en las células beta de los islotes de Langerhans. Por lo que respecta a los TAP, se ha encontrado que la protección esta ligada al alelo TAP2*0201 cuyo efecto parece ser dominante. Más aún, la susceptibilidad a la DMDI se incrementa cuando los pacientes son homocigotos para TAP2*0101 ($p < 0.001$), y a la vez existe una asociación significativa entre este alelo y la presencia de anticuerpos contra las células beta⁵⁰. Es importante hacer notar la ausencia y presencia de Thr, en los alelos TAP2*0201 y TAP2*0101 que confieren protección y susceptibilidad, respectivamente. El DRB1*03 predictivo para diabetes se asocia con una baja frecuencia de TAP1B, y el alelo TAP2B está ausente en los pacientes diabéticos que manifiestan alguna otra endocrinopatía autoinmune⁵¹. Otros han informado que los genes DRB1*03,*04 están en Δ negativo con el alelo TAP2B,. Por otro lado, la presencia de alelos protectores se halla

también en desequilibrio con algunos alelos TAP2. Así, el gen DRB1*01 está en Δ con TAP2A y TAP2B mientras que el DRB1*11 está en Δ con TAP2C⁵². En pacientes de Cerdeña, hay un exceso homocigotos de TAP2 Val/379, y una disminución en la frecuencia de TAP2 Ile/379⁵³. En el norte de Italia los diabéticos presentan disminuido el alelo TAP2B y el alelo TAP2A está incrementado. El alelo TAP2B confiere protección dominante en franceses⁵⁴. En españoles, en alelo TAP2A (TAP2*01) también está incrementado en pacientes con DMDI^{54,55} y en los daneses, los resultados concuerdan con la ausencia de TAP2B⁵⁶. En japoneses DQA1*0301 y DQB1*0401 están asociados a la DMDI, y confieren protección el DQA1*0103-DQB1*0501-DQB1*0601 y DQB1*0602. Los desequilibrios que se han observado son entre DQB1*0303 y TAP2C; DQB1*0401 y TAP2B; y existe un Δ - entre DQA1*0103 y TAP2A⁵⁷. Finalmente se ha demostrado que la disminución de expresión de clase I se asocia al desarrollo de DMDI en ratones NOD que desarrollan espontáneamente la enfermedad y en humanos, y que el nivel de mRNA de TAP1 se encuentra disminuido en estos ratones. Además también existe un incremento de Thr en la posición 665 de TAP2 en los pacientes japoneses con DMDI⁵⁸. En el Cuadro 3 se muestran los alelos de TAP implicados en el desarrollo de la DMDI descritos en otras poblaciones.

C. ARTRITIS REUMATOIDE

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad inflamatoria sistémica crónica y recurrente que inicialmente implica a las pequeñas articulaciones. Los síntomas incluyen fiebre, dolor y pérdida de peso. La enfermedad comienza en las pequeñas articulaciones de las manos y progresa hacia las grandes articulaciones dando lugar a deformaciones muy características en los miembros afectados. También hay una gran variedad de manifestaciones extraarticulares que incluyen vasculitis, atrofia de la piel y de los músculos, se forman nódulos subcutáneos, y llega a existir linfadenopatía, esplenomegalia y leucopenia. Recientemente se ha sugerido una posible relación entre virus de Epstein Bar (VEB) y el desencadenamiento de la AR, ya que el VEB es un estimulador policlonal de las células B y éstas pueden producir el factor reumatoide. Los linfocitos sinoviales producen IgG que es reconocida como extraña y por lo tanto estimula la síntesis de anticuerpos anti- IgG e IgM en las articulaciones un ejemplo de las cuales es el factor reumatoide. La presencia de agregados de IgG o complejos IgG-factor reumatoide resulta en la activación del complemento por la vía clásica y los complejos inmunes se depositan en las

articulaciones y activan a su vez al complemento por la vía alterna. Dicha activación del complemento conlleva a un fenómeno inflamatorio que incluye la liberación de histamina, la producción de factores quimiotácticos para polimorfonucleares y para células mononucleares, ocasionando daños en las membranas con la subsecuente lisis celular y acúmulo de células mononucleares en el espacio sinovial. Las prostaglandinas y leucotrienos juegan un papel importante en la mediación del proceso inflamatorio. El infiltrado mononuclear característico contiene linfocitos T y B pequeños, linfoblastos, células plasmáticas y macrófagos. La interacción de estas células trae como resultado la liberación de linfocinas, responsables de mayor acumulación de macrófagos en el sinovio y de la síntesis de inmunoglobulinas y factor reumatoide. La interacción de la fibronectina producida por los polimorfonucleares con los fibroblastos también juega un papel importante en el proceso erosivo. El factor reumatoide puede ser importante en el desarrollo de la enfermedad extraarticular, pues los pacientes con vasculitis reumática tienen títulos muy altos. Si se infunden complejos antígeno-anticuerpo a animales de experimentación en presencia de factor reumatoide de clase IgM, se induce vasculitis necrotizante.⁵⁹ La mayoría de los pacientes tienen hipergamaglobulinemia, del 20-70% de los pacientes presentan anticuerpos antinucleares, hipoalbuminemia, títulos altos de factor reumatoide y la enfermedad es poligénica con un modo de herencia complejo. La AR está fuertemente asociada con el DR4 en casi todas las poblaciones estudiadas incluyendo, caucásicos, negros-americanos, negros-africanos, mexicanos y japoneses.

En caucásicos, los alelos DRB1*0401 y *0404 se encuentran incrementados significativamente⁶⁰, mientras que en pacientes japoneses⁶¹ y judíos el subtipo responsable es el *0405⁶². Los residuos de las posiciones 67-74 de la tercera región hipervariable del DRB1 están involucrados en susceptibilidad y resistencia. En un estudio realizado por el grupo de Gorodezky y col. se demostró, que los alelos de susceptibilidad en población mexicana, son: DRB1*0404, *0401 y *1001, mientras que la protección se asocia intensamente al: DRB1*0701. La susceptibilidad o protección mediada por estos alelos es recesiva. El motivo comprendido entre los aminoácidos 67-74, y la presencia de valina o glicina en la posición 86 de la cadena beta del DR son relevantes no sólo en el desarrollo sino también como mediadores de la severidad de AR en mexicanos. Por otro lado los alelos de protección tienen D-70 o bien V-86 en ausencia del anterior⁶³.

Cuadro 3: Alelos TAP asociados a DMIDI reportados en otras poblaciones

	ALELOS DE SUSCEPTIBILIDAD	LD	ALELOS PROTECTORES	LD
Noruega y Finlandia	TAP2	THR/665	DR4-DQ8 DR3-DQ2	DR1-DQ5 DR13-DQ6
Finlandia	333/TAP1	ILE/VAL		
Caucásicos Italianos y Españoles	637/TAP1 TAP2*0101 TAP2A	ASP/ASP	DRB1*03,*04	DRB1*01 DRB1*11
Cerdeña	379/TAP2	VAL		
Japoneses	TAP2B TAP2C 665/TAP2	THR	DQB1*0401 DQB1*0303	DQA1*0103

Tomado de: 48, 49, 50, 52, 54, 56, 53, 58, 57, * En españoles, franceses y daneses

La susceptibilidad/protección depende de la combinación de residuos básicos en estas posiciones y la presencia de un aa no polar en la posición 86 contribuye a la resistencia. La severidad de la enfermedad, también depende del HLA, ya que se ha observado que el DQA1*03011-DQB1*0302 está presente en pacientes que desarrollan severas lesiones en presencia de cualquier subtipo de DR4⁶³. Con lo que respecta a los genes TAP, en Inglaterra, se describió una fuerte asociación del DRB1*0401 con la RA, y una asociación entre el alelo TAP2D y el DR4⁶⁴. En noruegos se observó un incremento de los alelos TAP1B y TAP2C/D en individuos con artritis reumatoide juvenil los cuales se encuentran en Δ con el DR8 que se asocia directamente con la enfermedad⁶⁵. Los finlandeses informaron un Δ entre el alelo TAP2E y el B27/DRB1*0404⁶⁶.

D. CARDIOPATÍA REUMÁTICA

Es una enfermedad colágeno-vascular que afecta varios órganos y es una de las complicaciones posestreptocócica en el humano. Existe una susceptibilidad que va del 2-3% en la población normal a la edad de entre 5 y 15 años. Las manifestaciones clínicas consisten en inflamación de las articulaciones, corazón, cerebro y piel, y pueden estar involucrados uno o todos estos órganos, pero el corazón es el órgano que se afecta más seriamente⁵⁹. Inicialmente se pensaba que el daño tisular se debía a la invasión directa de la bacteria al tejido, o bien a un efecto de las toxinas estreptocócicas, pero recientemente se ha demostrado un mecanismo inmunológico en la patogénesis del daño tisular, debido a la presencia de auto-anticuerpos circulantes dirigidos contra el tejido cardíaco en pacientes que desarrollan carditis reumática. Posteriormente se encontró que los anticuerpos anti-antígenos estreptocócicos celulares infundidos a animales de laboratorio, reaccionan con el tejido cardíaco y con otros tejidos humanos que se afectan por el proceso inflamatorio en la fiebre reumática. Algunos antígenos relacionados con la proteína M de pared celular del estreptococo y otros presentes en la membrana protoplasmática, presentan reactividad cruzada con el sarcolema del músculo cardíaco. Recientemente se ha demostrado una homología estructural entre la proteína M y la tropomiosina muscular. Además, hay reactividad cruzada entre un grupo específico de polisacáridos y las glicoproteínas valvulares, entre antígenos estreptocócicos de membrana plasmática y tejido neuronal del núcleo caudado y subtalámico y entre el ácido hialurónico capsular del estreptococo y el cartilago articular. La identificación de estos antígenos de reacción

cruzada fundamenta la teoría para explicar el daño tisular debido a los anticuerpos citotóxicos inducidos por el estreptococo. Estos anticuerpos se pueden absorber del suero con estreptococo del grupo A y con tejido cardíaco⁵⁹. El 80-85% de los pacientes con daño valvular tienen un nivel elevado de anticuerpos anti-antígenos celulares del estreptococo por aproximadamente 10 años, a diferencia de los pacientes con fiebre reumática sin daño cardíaco que desarrollan nefritis postestreptocócica en los que el nivel de anticuerpos desciende al valor normal en aproximadamente 2 años. Las manifestaciones clínicas de la fiebre reumática son precedidas por faringitis en dos tercios de los pacientes, en la mitad de los cuales es leve y escapa a la atención clínica. Después de un periodo de latencia de 2 a 3 semanas en las cuales los pacientes son asintomáticos, aparecen los síntomas de reumatismo agudo, y la manifestación más común es la artritis de grandes articulaciones 80% de los pacientes. La carditis ocurre en la mitad de los pacientes con fiebre reumática y va de leve a severa involucrando al endocardio, miocardio y pericardio (pancarditis). La pancarditis severa es potencialmente fatal. En el 5% de los pacientes hay *rash*, nódulos subcutáneos que son firmes con dolor y discretos, fiebre, dolor abdominal usualmente periumbilical, asociado con náusea y algunas veces vómito, que puede confundirse con apendicitis aguda. La carditis muestra claras anomalías electrocardiográficas. El diagnóstico requiere de análisis clínicos, bacteriológicos y pruebas serológicas que demuestren el antecedente de infección estreptocócica.⁵⁹

Los datos analizados en el XII Taller de Histocompatibilidad de asociaciones de HLA con cardiopatía reumática muestra que existe un incremento de los antígenos asociados al DR53 (DR4 y DR7) en pacientes egipcios y el DRB1*0403 se encuentra significativamente incrementado en pacientes mexicanos, en pacientes de la India, turcos y brasileños no se ha confirmado aún ninguna asociación³⁶. En cuanto a TAP no se han realizado estudios en esta enfermedad.

E. SÍNDROME DE VOGT KOYANAGI HARADA

El síndrome de VKH es un padecimiento sistémico que involucra ojos, oídos, piel y meninges. Se caracteriza por uveítis anterior bilateral, aguda y severa, asociada a vitiligo; alopecia, poliosis y disacusia. La enfermedad de Harada fue descrita en 1926 como una uveítis posterior severa con desprendimiento de retina, signos de irritación meníngea y pleocitosis en el líquido cefalorraquídeo. Ambos padecimientos se superponen, de tal manera que pueden ser

considerados como parte de un mismo síndrome, "síndrome de Vogt Koyanagi Harada".^{67,68,69} Predomina en orientales y en indígenas americanos. Su frecuencia va de 1 a 3.7% en Estados Unidos, hasta un 8% en Japón y 14.4% en Argentina. En la Clínica de Uveitis del hospital "Dr. Luis Sánchez Bulnes" de la Asociación para Evitar la Ceguera en México, se ha informado una frecuencia de 9.5% (Mendoza E. y Arellanes L., datos no publicados). Algunos autores han descrito el síndrome VKH en pacientes de raza negra aunque la mayoría de ellos tienen ancestros de origen amerindio⁷⁰. Las descripciones clásicas del síndrome incluyen: etapa prodrómica caracterizada por signos catarrales, cefalea, meningismo y disacusia; etapa oftálmica, con desarrollo de iridociclitis, vitritis, hiperemia de papila y desprendimiento de retina seroso; finalmente la etapa de convalecencia en la cual desaparece la uveitis y se manifiestan las alteraciones cutáneas. El factor racial parece tener importancia no solamente en su prevalencia, sino también en la frecuencia de presentación de las manifestaciones extraoculares. La disacusia se ha informado en el 74% de los pacientes japoneses⁶⁹, y en México ocurre en el 39% de los casos; la poliosis-alopecia se presenta en el 60% y el vitiligo en el 25% en japoneses, mientras que en mexicanos aparece en el 21.73%, respectivamente. En un estudio en pacientes de origen hispano, los datos son semejantes pues reportan 21% de afección dermatológica, 17% de cambios audiológicos y síntomas meníngeos, principalmente cefalea en el 67%. Esto último también concuerda en los mexicanos (60.8%)⁷⁰. Al inicio del padecimiento el paciente refiere fotofobia, visión borrosa y enrojecimiento ocular⁶⁹. Se observa más frecuentemente en mujeres, entre la tercera y cuarta décadas de la vida.⁷¹ Se sabe que existe una respuesta mediada por células T dirigidas contra antígenos oculares y se han identificado autoanticuerpos contra pigmento uveal, fotorreceptores y mielina. Además, hay una respuesta de hipersensibilidad celular cutánea dirigida contra pigmento uveal, así como niveles elevados de complemento, particularmente de C3⁷². Las células T predominan en el infiltrado coroideo en un 70% de los pacientes y también se hallan en sangre periférica y líquido cefalorraquídeo, en donde abundan las células Th (cooperadoras). Los linfocitos T también infiltran el limbo, y la epidermis de las zonas cutáneas con vitiligo. El acúmulo de linfocitos T, la presencia de células plasmáticas, la distribución generalizada de macrófagos y la detección de anticuerpos contra la retina detectados en suero, indican que se trata de un proceso autoinmune. Se ha demostrado una importante asociación de los antígenos HLA-DR4, HLA-DR5 y HLA-B54 en pacientes japoneses⁷³, en una población con ancestros indígenas americanos se asociaron los antígenos HLA -DR4, HLA-DR53, HLA-DQ3 y

el haplotipo HLA-DR4/DQ3 con VKH⁷⁴. En mexicanos se demostró un incremento de los antígenos HLA DR4 y DR1 ($p = <0.00001$, $pc = <0.0003$) Gorodezky⁷⁵, en el cual el análisis molecular mostró que no hay ningún subtipo particular del DR4 involucrado, sugiriendo que la región conservada del alelo participa asociando péptidos particulares de la melanina con la afinidad necesaria para presentar la secuencias adecuadas al TCR para la inducción de la respuesta autoinmune. Un mecanismo adicional está dado por el DRB1*0101 que comparte el mismo motivo presente en el DRB1*0405 que es un gen fuertemente involucrado en la susceptibilidad en japoneses y brasileños. Con respecto a los genes TAP no existe ningún estudio publicado.

F. IMPLICACIÓN DE TAP EN OTRAS ENFERMEDADES

En un estudio realizado en finlandeses con espondilitis anquilosante no se encontró ninguna diferencia en la distribución de frecuencias de TAP1 y TAP2 al comparar pacientes irlandeses HLA-B27+ contra individuos sanos también HLA-B27+. Sin embargo el alelo TAP2E se encontró significativamente elevado en los individuos sanos HLA-B27+ comparados con sanos HLA-B27- (16-22% vs 1-7% $pc = 0.008$)⁷⁶. En 34 pacientes de E.U. con síndrome de Reiter (SR) de los cuales 28 eran HLA-B27+, los cuales se compararon con 80 individuos sanos y con un grupo de sujetos sanos HLA-B27+, se observó un incremento del alelo TAP1C (13% vs 3% $pc = 0.009$), y un incremento de TAP2A (77% vs 55% $p = 0.002$) contra los sanos elegidos al azar. El alelo TAP2A en SR se mantuvo asociado a la presencia del B27 en los sanos. (76% vs 52% $p = 0.004$). Más aún, TAP2A se hallaba en el 100% de los pacientes ($p = 0.003$), por lo que se concluyó que la asociación es independiente del HLA-B27, por lo que a pesar de que los genes TAP están genéticamente separados de los clase I, se encuentran funcionalmente ligados contribuyendo ambos a la susceptibilidad al SR⁷⁷.

En enfermedad celiaca se observó a TAP2*0101 asociado en enfermos franceses, caucasicos y norafricanos, mientras que TAP2*0201 parecía conferir protección. TAP2*0101 se halló en desequilibrio de enlace con el DR3 que está fuertemente asociado a la enfermedad⁷⁸. En ingleses, se observaron TAP1A y TAP2A incrementados en la enfermedad y en desequilibrio de enlace con el HLA-DQ2 asociado intensamente a la enfermedad celiaca en esta población⁷⁹.

No se encontró relación de TAP1 ni TAP2 en esclerosis múltiple en belgas, ingleses ni noruegos^{80,81,82}. En otro estudio realizado en ingleses, no se observó ninguna diferencia en la

distribución de TAP1 ni TAP2, pero se encontró un nuevo dimorfismo en el codón 386 de TAP2, que corresponde a una mutación silenciosa, llamando I y J a los dos diferentes alelos. La distribución de estos alelos mostró un incremento del alelo J en los pacientes con esclerosis múltiple que no está en desequilibrio de enlace con el DRB1*1501, de susceptibilidad por lo que parece J un nuevo marcador genético de susceptibilidad⁸³. En el norte de Irlanda, se observó que los pacientes portadores del haplotipo de susceptibilidad HLA DRB1*1501-DQB1*0602 son homocigotos para TAP2-379-Val y TAP2-565-Ala⁸⁴.

En Miastenia Gravis el alelo TAP2*0101 se relaciona con un inicio temprano de la enfermedad, y está en desequilibrio de enlace con el DQB1*02⁸⁵.

El alelo TAP2A/F se halló incrementado en tuberculosis pulmonar ($p=0.01$) en indios, y TAP2B en lepra tuberculoide ($p=0.003$)⁸⁶. En el Cuadro 4 se presenta en forma esquematizada estos hallazgos.

En Alemania, observaron que para la Psoriasis el haplotipo HLA DRB1*0701/2-DQA1*0201-DQB1*0303 es de susceptibilidad, y TAP no mostró ninguna asociación tampoco ningún alelo de DP⁸⁷. En pacientes japoneses con Sarcoidosis se estudió TAP2 y no se encontró ninguna asociación⁸⁸. No se observó relación de TAP con lupus eritematoso sistémico en chinos⁸⁹, y tampoco en ingleses⁹⁰.

Cuadro 4: Alelos de TAP asociados a otras enfermedades

ENFERMEDAD	ALELO DE SUSCEPTIBILIDAD	DESEQUILIBRIO ENLACE
Artritis *(2B)	2D	DR4
	1B	DR8
	2C/2D	DR8
	2E	
Enfermedad Celiaca *(TAP2*0201)	1A, 2A	DQ2
	TAP2*0101	DR3
Esclerosis múltiple	TAP2	Pac. negativos:
	Val/Val-333, Ala/Ala-565	DRB1*1501-DQB1*0602
Síndrome de Reiter	2A, 2C	
Psoriasis	TAP*0101	
Lepra tuberculoide	2B, 1C	Independiente al DR15
Nefropatía membranosa	TAP1	
	Val/333, Gly/637	
Miastenia gravis	TAP2*0101	DQB1*02

* alelos de protección. Datos tomados de: 76, 77, 78, 79, 87, 88, 80, 81, 82, 83, 84, 89, 90, 85, 86

IV. OBJETIVOS

1. OBJETIVOS GENERALES

- Conocer el patrón molecular del polimorfismo de los genes TAP en población mexicana.
- Identificar si estos genes contribuyen a la expresión de alguna enfermedad autoinmune en las que se ha demostrado claramente la participación del MHC.

2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Efectuar la tipificación molecular de los genes TAP1 y TAP2 en población mestiza e indígena sana, para conocer su distribución y polimorfismo y entender los orígenes ancestrales de los alelos presentes en México. Así mismo, identificar si existen alelos no descritos previamente en otras poblaciones.
- Seleccionar algunas enfermedades autoinmunes para investigar la distribución a nivel de los genes TAP1 y TAP2. Estas son la diabetes tipo I, la artritis reumatoide, la cardiopatía reumática y el síndrome de VKH.
- Obtener las frecuencias alélicas de todos los grupos estudiados y aplicar el análisis estadístico para demostrar si existen alelos de susceptibilidad o protección en las diferentes enfermedades autoinmunes en mexicanos.
- En el caso de encontrar alguna asociación de los distintos alelos de TAP con alguna de las enfermedades, efectuar el análisis de desequilibrio de enlace para ver si dicha asociación es una contribución independiente o bien si ésta sólo se debe a desequilibrio de enlace con otros alelos HLA.
- Correlacionar con los datos informados en la literatura, para demostrar la participación de estos alelos en dichas enfermedades.

V. JUSTIFICACIÓN

- En base a los antecedentes descritos, se consideró importante analizar el polimorfismo de los genes TAP tanto en la población mestiza sana, como en un grupo de indígenas y explorar la participación de estos genes en las enfermedades autoinmunes descritas anteriormente, ya que no hay ningún dato informado para esta población con respecto a otros loci ni en población general, ni su participación en enfermedades.

VI. HIPÓTESIS

- La distribución de alelos de los loci TAP1 y TAP2 es diferente en población mestiza mexicana que en caucásicos y orientales. El análisis en seris demuestra la contribución genética de los ancestros originales y contribuirá al entendimiento de la genética de la población mexicana.
- En algunas de las enfermedades autoinmunes se espera encontrar la contribución de los genes TAP en la susceptibilidad o resistencia debido a su función central en el transporte de péptidos tanto propios como extraños.

V. JUSTIFICACIÓN

- En base a los antecedentes descritos, se consideró importante analizar el polimorfismo de los genes TAP tanto en la población mestiza sana, como en un grupo de indígenas y explorar la participación de estos genes en las enfermedades autoinmunes descritas anteriormente, ya que no hay ningún dato informado para esta población con respecto a otros loci ni en población general, ni su participación en enfermedades.

VI. HIPÓTESIS

- La distribución de alelos de los loci TAP1 y TAP2 es diferente en población mestiza mexicana que en caucásicos y orientales. El análisis en seris demuestra la contribución genética de los ancestros originales y contribuirá al entendimiento de la genética de la población mexicana.
- En algunas de las enfermedades autoinmunes se espera encontrar la contribución de los genes TAP en la susceptibilidad o resistencia debido a su función central en el transporte de péptidos tanto propios como extraños.

VII. MATERIAL Y MÉTODOS

1. POBLACIONES DE ESTUDIO

En este trabajo se incorporaron dos tipos de poblaciones. Dos de ellas son grupos sanos. Uno está formado por mestizos de la población general del altiplano, el segundo es una población indígena, ya que se sabe que los grupos aislados tienen características genéticas propias que pueden permitir el análisis de orígenes, migración y mezclas génicas. Este grupo indígena es el de los seris. Por otro lado se incorporaron cuatro enfermedades con rasgos de autoinmunidad con el objeto de investigar la participación de alelos de TAP en la susceptibilidad y/o protección en cada una de ellas, dada la importancia funcional ya mencionada de los genes TAP. Las enfermedades que se incluyen son: diabetes mellitus dependiente de insulina (DMDI), artritis reumatoide (AR), fiebre reumática (FR) y síndrome de Vogt Koyanagi Harada (VKH). A continuación se describe a cada una de las poblaciones estudiadas:

a) Población mestiza mexicana: Se seleccionaron 87 individuos no relacionados aparentemente sanos, sin antecedentes familiares de ninguno de los padecimientos de estudio. Todos ellos son mestizos mexicanos originarios en su mayoría de la zona del altiplano. El 50% son del sexo femenino. Los sujetos incorporados al estudio forman parte del personal del INDRE, estudiantes y donadores voluntarios del Banco de Sangre del Hospital de la mujer. Este se utilizó como control de comparación.

b) Población indígena mexicana: Se incluyeron 97 seris, de los cuales el 65% fueron mujeres, que son una tribu indígena del estado de Sonora. Nunca fueron formalmente conquistados por los españoles, y menos aún evangelizados y pacificados, ya que su territorio no era fácilmente aprovechable, no tenían riqueza acumulada y no producían suficiente para hacer redituable la conquista, siendo inútiles como mano de obra para cultivar y servir, pues desconocían esas actividades. Por estas razones, conservaron durante más tiempo que otros

pueblos indígenas su autonomía y su identidad cultural. Su aislamiento permitió la conservación de algunas características génicas y su ubicación en sitios inhóspitos, pudo ser cuna para la generación de otros alelos como respuesta a la adaptación al nuevo territorio o a muchos otros factores. Los seris pertenecen a la familia lingüística Hokano-Coahuitleca, el 96% son bilingües (seri-español), habitan en dos localidades de la costa desértica del estado de Sonora: Desemboque, municipio de Pitiquito, y Punta Chueca y además en la Isla Tiburón que se ubica al oeste de la costa de Sonora; los principales problemas de salud son: infecciones virales, respiratorias, gastrointestinales, obesidad y ceguera⁹¹.

c) Pacientes con DMDI: se eligieron 66 pacientes con diabetes tipo I, pertenecientes a la consulta de diabetes de la Unidad de Crecimiento y Desarrollo del Instituto Nacional de Pediatría, los cuales fueron diagnosticados por endocrinólogos expertos de acuerdo a los criterios de la Organización Mundial de la Salud y del National Diabetes Data Group.. El 52.5 % son pacientes femeninas, con una edad promedio de 11.9+/-4.15 años y una edad de inicio de 8.64+/-4.2 años. El tiempo de evolución de la enfermedad en el momento del estudio fue de 3.3+/-3.2 años. La mayoría son originarios del D.F. (60%) y el resto en menor frecuencia de Guadalajara, Hidalgo, Edo. de México y otros lugares de país. El 10.5% tenían asociados otros padecimientos crónicos como tiroiditis, vitiligo, bocio difuso, hipertiroidismo, Hashimoto, escleroderma, enfermedad articular y cardiopatía reumática.

d) Pacientes con artritis reumatoide: Se incluyeron 47 pacientes mestizos mexicanos con diagnóstico de artritis autoinmune que fueron seleccionados de acuerdo a los criterios del American Rheumatism Association y que provenían de la consulta de la Unidad de Reumatología del Hospital General de México. El 90% eran mujeres con una edad promedio de 42.4+/-13.1 años. El 52.8% de los pacientes tenían un tiempo de evolución de la enfermedad menor a 5 años y el 47.2% de 5.1-46 años. El 40 % tenía nódulos reumatoides, el 22% tenía asociado síndrome Sjögren y el resto presentaba vasculitis, tenosovitis, escleritis, artrosis y anemia.

e) Pacientes con Cardiopatía Reumática: Se seleccionaron 37 pacientes con cardiopatía reumática, pertenecientes a la consulta externa del Hospital de Cardiología del Centro Médico Nacional Siglo XXI IMSS, los cuales se diagnosticaron de acuerdo a los criterios revisados de Jones (cardiopatía reumática mediante electrocardiografía, estudios clínicos e inmunológicos), el 70% eran mujeres, 25% menores de 40 años, de los cuales el 73.3% tenían afección cardíaca y el

6.7% tenía antecedentes familiares de daño cardíaco. Sus principales manifestaciones clínicas son artralgias, fiebre, carditis y poliartritis.

f) Pacientes con síndrome de Vogt Koyanagi Harada: se estudiaron 43 pacientes remitidos de la clínica "Dr. Luis Sánchez Bulnes" de la Asociación Para Evitar la Ceguera en México pertenecientes a la consulta del servicio de uveítis, que acudieron a consulta en el período 1988-1995. Se les aplicó un examen general y un examen oftalmológico muy cuidadoso. El diagnóstico se llevo a cabo por los expertos en uveítis de acuerdo a los criterios sugeridos por la Sociedad Americana de Uveítis ⁵¹. El 75% eran mujeres con una edad media de 33.5 años, presentando como principales formas clínicas: dolor, tinitus, pérdida de la visión, alopecia, náuseas, vitiligo, poliosis y dolor de cabeza. En el Cuadro 5 se presentan las características de los grupos incluidos en el estudio.

2. EQUIPO, MATERIAL Y REACTIVOS

Estos se encuentran junto con la preparación de reactivos en el Apéndice.

3. MÉTODOS

A. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL DNA GENÓMICO⁹²

Un aspecto fundamental de este trabajo es la obtención de DNA en cantidades razonables y de alta pureza. Existen varias metodologías que permiten su obtención partiendo de diferentes fuentes, gotas de sangre seca, semen, tumores, cabellos o tejidos antiguos. En este caso se obtuvo DNA de todos los sujetos incluidos en el estudio a partir de leucocitos obtenidos de sangre periférica. El método consiste en la eliminación de eritrocitos mediante choque hipotónico para dejar limpios a los leucocitos. Posteriormente se lisan los leucocitos para liberar el DNA. La lisis puede llevarse a totalidad utilizando detergentes iónicos como el SDS. Alternativamente se puede hacer una lisis parcial con detergentes no iónicos como el NP-40 o el Tritón X-100. En este trabajo se obtuvieron núcleos que se lisaron con SDS.

a) Obtención de las muestras y lisis con $MgCl_2$ y nonidet p-40. Obtención de núcleos

1. Se toman 20 mL de sangre periférica en tubos vacutainer que contienen EDTA como anticoagulante.
2. Vaciar los 20 mL de sangre a un tubo de centrifuga de 50 mL.
3. Centrifugar a 3,000 r.p.m. durante 15 min. a 4°C .
4. Separar el plasma, con una pipeta Pasteur.
5. Tomar cuidadosamente la capa de glóbulos blancos (Buffy Coat) que está en la parte superior de los glóbulos rojos y pasarla a otro tubo de 50 mL.
6. Agregarle al tubo que contiene el Buffy Coat solución I hasta llenar el tubo. Agitar suavemente.
7. Centrifugar a 3,000 r.p.m. durante 15 min. a 4°C. Desechar cuidadosamente el sobrenadante.
8. Repetir los pasos 6 y 7 hasta que queden las células blancas libres de eritrocitos (generalmente con 2 pasos de lisis es suficiente).
9. Pasar el paquete de células blancas a un tubo de 15 mL.
10. Agregar solución II, agitando para desprender el paquete, completar el volumen del tubo con la solución II.
11. Centrifugar a 3,000 r.p.m. durante 15 min. a 4°C y desechar cuidadosamente el sobrenadante. En el fondo del tubo se encuentra el paquete de núcleos.
12. Agitar en vortex con el pequeño volumen que haya quedado en el tubo.

En este paso se pueden congelar los núcleos a -20°C ó -80°C ó se puede continuar con la extracción en este caso por el método de fenol cloroformo. La congelación se puede hacer directamente en los mismos tubos en los que se ha trabajado. No se debe descongelar hasta el momento de realizar la extracción del DNA.

Cuadro 5: Poblaciones incluidas en el estudio

<p>Mestizos Mexicanos 87 sanos 50% mujeres</p>	<p>Seris 97 Individuos 65% mujeres</p>
<p>DMDI 66 pacientes U. de Crecimiento y desarrollo. INP 52.5% F Edad 11.9a \pm 4.15 Edad inicio 8.64a \pm 4.2 Tiempo Evol. 3.3 \pm 3.2a</p>	<p>Artritis Reumatoide 47 Pacientes U. Reumatología del HGM 90% F Edad 42.4a \pm 13.1 Tiempo. de Evol. 52.8% <5a FR(+) 80%</p>
<p>Cardiopatía Reumática 37 pacientes H. Cardiología. CMN Siglo XXI, IMSS 70% F 25% < 40 años 93% con antecedentes de FR</p>	<p>Síndrome VKH 43 pacientes APEC en México 75% F Edad de inicio= 33.5 a Evolución cronicidad 69%</p>

b) Obtención de DNA mediante digestión con proteinasa K⁹²

1. Añadir 4 mL del amortiguador de lisis para glóbulos blancos (WCLB) a los núcleos obtenidos en el paso anterior.
2. Se deja incubando toda la noche a 53°C en baño maría; si es posible utilizar un agitador rotatorio (50 r.p.m.).
3. Después de este lapso se procede al protocolo de extracción de fenol-cloroformo.

c) Extracción con fenol cloroformo⁹²

1. Añadir al tubo un volumen equivalente al que se tiene (v/v) de una solución con fenol saturado.
2. Agitar 10 minutos manualmente de manera suave hasta obtener una emulsión completa.
3. Centrifugar 15 min. a 3,000 r.p.m. (1,600 xg) a 4°C.
4. Colocar los tubos en hielo al terminar.
5. Tomar la fase superior y pasarla a un tubo limpio (no tomar la interfase).
6. Hacer una segunda extracción con fenol saturado de la misma manera.
7. Transferir la fase superior a un tubo limpio.
8. Realizar dos extracciones con fenol/cloroformo (v/v) centrifugando 15 min. a 3,000 r.p.m. a 4°C.
9. Pasar la fase superior a un tubo limpio.
10. Hacer una última extracción con 4mL de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1, v/v).
11. Centrifugar 15 min. a 3,000 r.p.m. a 4°C.
12. Pasar la fase superior a un tubo nuevo.

Los materiales utilizados para la extracción de DNA deben ser de polipropileno que es resistente al fenol y al cloroformo. No se recomienda usar tapones de hule porque son susceptibles a la acción de estos solventes e interfieren con la pureza del DNA. Todos los materiales que se utilicen deben estar estériles para evitar la presencia de nucleasas. Es recomendable, trabajar con guantes durante el proceso de extracción. Es importante también que la pureza de los reactivos sea muy alta porque, si no es así, la calidad del DNA disminuye, o puede degradarse. En el caso de que el fenol no pueda adquirirse de fuentes comerciales que lo

proveen ultrapuro y con calidad para extracción de DNA, éste debe bidestilarse en el laboratorio.

d) Precipitación con isopropanol absoluto

El isopropanol no precipita al RNA y de esta manera evita que interfiera en la lectura de la densidad óptica del DNA.

1. Al tubo que contiene la extracción de DNA añadirle NaCl 3M o 5M para obtener una concentración final de 100 mM. (120 μ L)
2. Adicionar un volumen de isopropanol absoluto. (3-4 mL)
3. Agitar suavemente hasta que se forme un precipitado blanco. La precipitación terminará cuando el precipitado flote (DNA).
4. El DNA flotante se puede recoger con una micropipeta y se pasa a un tubo Eppendorf de 1.5 mL.
5. Lavar con 200 μ L de etanol al 70% frío, centrifugar y descartar el etanol.
6. Una vez seco el DNA, se resuspende en 400 μ L de TE 1X
7. Para que el DNA se resuspenda completamente puede dejarse 2 ó 3 días a 4°C o varias horas en agitación continua a 65°C.
8. Para obtener la concentración del DNA leer a 260 nm. Puede leerse toda la muestra de DNA o hacer una dilución (1:100 ó 1:50).

Para saber la relación entre el fenol y las proteínas que pudieran estar contaminando el DNA, se hace una lectura a 240 nm y a 280 nm, respectivamente. La relación de los valores de las lecturas 260/280 y 260/240 deben estar entre 1.7 y 2.0. La primera indica contaminación con proteínas y la segunda con fenol.

B. TIPIFICACIÓN DE LOS GENES TAP POR PCR-ARMS⁹³

La tipificación de los genes TAP se realiza de acuerdo a los protocolos del XII Taller Internacional de Histocompatibilidad. Se emplea la técnica de PCR-ARMS (Amplification Refractory Mutation System), la cual permite la genotipificación rápida de cualquier mutación o polimorfismo conocido. El método se basa en la observación de que bajo condiciones adecuadas un iniciador con un "mismatch" (desapareamiento) en el extremo 3' no permite la amplificación por PCR. Se utilizan 4 iniciadores. Dos de ellos son uno sentido y otro anti-sentido, diseñados de

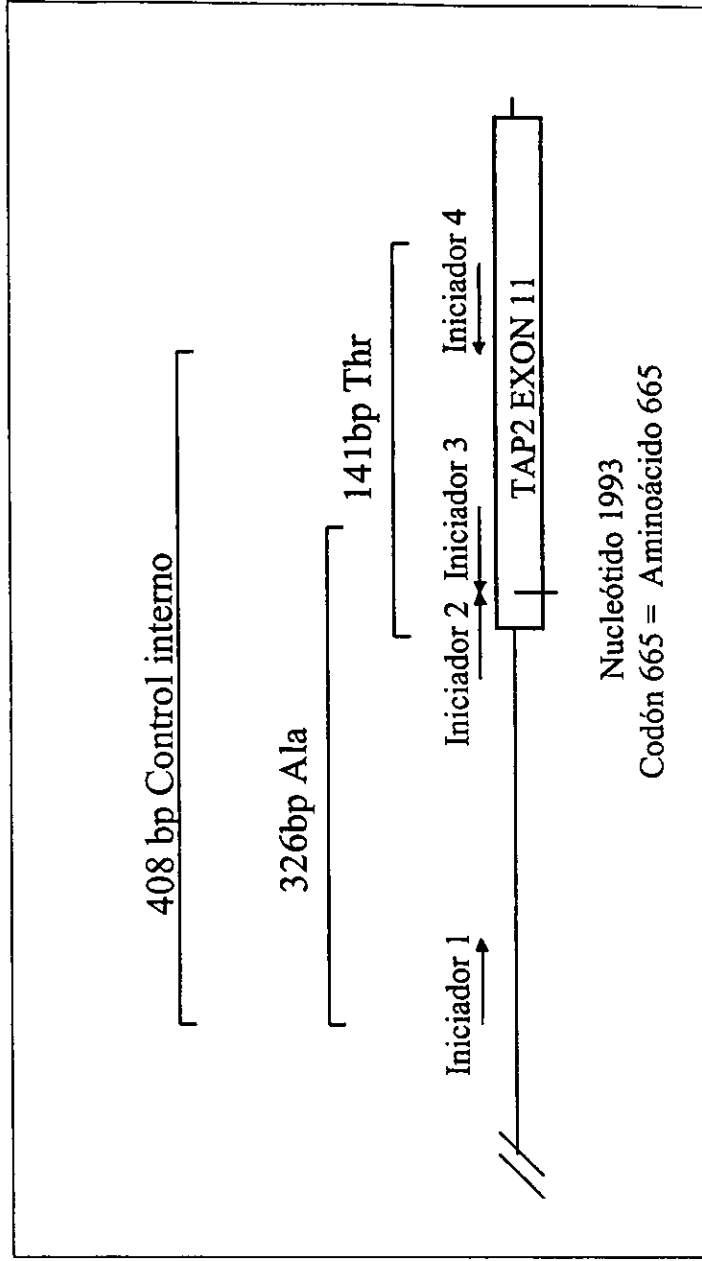
tal manera que sus nucleótidos 3' terminales sean complementarios a una de las variantes del nucleótido dimórfico (nucleótido que presenta dos posibilidades) a tipificar, el cual da lugar a la sustitución de un aminoácido en la proteína. Además se introducen "mismatches" premeditados a uno o dos nucleótidos del extremo terminal 3' de cada iniciador para aumentar la especificidad, de tal forma que no permite la amplificación por PCR a menos que el nucleótido dimórfico sea complementario al del iniciador correspondiente. Los otros dos iniciadores, uno sentido y otro anti-sentido son complementarios a las secuencias flanqueadas que se localizan a distancias asimétricas a uno y otro lado del nucleótido dimórfico. La amplificación da como resultado un producto constante (control interno) simultáneamente con uno o dos productos alelo específicos, dependiendo de sí el individuo es homocigoto o heterocigoto.⁹³ En la Figura 6 se esquematiza la estrategia para la tipificación.

a) Amplificación del DNA por PCR-ARMS

Por cada DNA a tipificar se prepara la siguiente mezcla de amplificación para TAP-1 y TAP-2:

	Cantidad	Concentración final
DNA	3 μ L	0.1-1 μ g
dNTPs	5 μ L	200 μ M
Amortiguador 10X	5 μ L	
MgCl ₂	3 μ L	1.5 mM
Iniciador 1	100 ng	2 ng/ μ L
Iniciador 2	100 ng	2 ng/ μ L
Iniciador 3	100 ng	2 ng/ μ L
Iniciador 4	100 ng	2 ng/ μ L
Taq pol.	0.2 μ L	1 U
H ₂ O	cbp 50 μ L	

Figura 6 :Tipificación de los genes TAP por PCR-ARMS



Bignon JD; Fernandez-Viña M (36, 93) 1996

Las cantidades de esta mezcla están calculadas para la amplificación de una sola muestra. Los cálculos deberán hacerse de acuerdo al número de muestras que se van a amplificar. El volumen de amplificación es de 50 μ L y se utilizaron tubos para PCR (thin wall Robbins Scientific) de 0.5 mL.

Las secuencias de los iniciadores utilizados se presentan en el Cuadro 6. El iniciador 1 y 4 de cada mezcla son complementarios a las secuencias flanqueadas que se localizan a distancias asimétricas del nucleótido dimórfico; mientras que los iniciadores 2 y 3 contienen en el nucleótido 3' terminal (señalado en negritas) a una de las variantes del nucleótido dimórfico que se va a tipificar, y el nucleótido subrayado corresponde al "mismatch".

1. En los tubos previamente rotulados, se coloca la cantidad calculada de DNA,
2. Preparar la mezcla para el número de muestras a amplificar en un tubo Eppendorf de 1.5 mL. Se recomienda adicionar primero el agua, enseguida el amortiguador, los nucleótidos trifosfato, el cloruro de magnesio, iniciadores, y hasta el final la enzima Taq polimerasa. **Todos los componentes de la mezcla deben manejarse en un baño de hielo, y la enzima se saca del congelador hasta el momento en que se va a utilizar.**
3. Homogeneizar perfectamente cuidando de no producir espuma.
4. Adicionar la cantidad requerida a cada uno de los tubos que contienen el DNA.(lo más rápido posible).
5. Agregar una gota de aceite mineral a cada uno de los tubos.
6. Dar un pulso en la centrifuga para homogeneizar.
7. Colocar los tubos en el termociclador y correr el programa para la amplificación de los genes TAP.

Se empleó un termociclador MJ Research PTC-200 con las siguientes condiciones de amplificación:

TAP-1:

95°C 5min	}	35 ciclos
95°C 1min		
65°C 1min		
72°C 2min		
72°C 10min		

TAP-2:

95°C 5min	}	35 ciclos
95°C 1min		
63°C 1min		
72°C 2min		
72°C 10min		

b) Verificación de la amplificación

1. Una vez terminada la amplificación se prepara un gel de agarosa al 2% en TAE 1X y bromuro de etidio (10 µg/µL) 2.5 µL por cada 50 mL de solución.
2. Analizar electroforéticamente 10 µL de la reacción de amplificación con 5 µL del amortiguador de corrimiento LB 5X. Para verificar el tamaño de las bandas obtenidas se incluye como marcador de peso molecular 3 µL de pBR322 HCl, 7 µL de agua y 5 µL de LB 5X.
3. Montar las muestras en el gel y correr a 90 V. durante 1 hora, o el tiempo necesario.
4. Visualizar las bandas en el transiluminador. Las bandas obtenidas corresponden con los siguientes tamaños en pb:

Combinación de iniciadores	TAP 1			TAP 2	
	<u>333</u>	<u>637</u>	<u>379</u>	<u>565</u>	<u>665</u>
1 y 4	533	429	427	400	408
1 y 3	Ile-241	Asp-307	Val-328	Thr-161	Thr-141
2 y 4	Val-351	Gly-180	Ile-158	Ala-298	Ala-326

Cuadro 6 : Secuencias de los iniciadores utilizados para la tipificación de TAP por PCR-ARMS

TAP1 posición 333

Primer 1. 5'-CCC TGC ACT GAG ATT TGC AGA CCT CTG GAG-3'
Primer 2. 5'-GAT CAG TGT CCC TCA CCA TGG TCA CCC GGA-3'
Primer 3. 5'-GGG CAG AAG GAA AAG CAG AGG CAG GGT CAC-3'
Primer 4. 5'-ACC TGG GAA CAT GGA CCA CAG GGA CAG GGT-3'

TAP1 posición 637

Primer 1. 5'-CAT CTT CCC AGA ATC TCC CCT ATC CAG CTA-3'
Primer 2. 5'-CAT CTT GGC CCT TTG CTC TGC AGA GGT ACA-3'
Primer 3. 5'-ACC CCC TGA CAG CTG GCT CCC AGC CTC CC-3'
Primer 4. 5'-TGG GGA GGC ATC CAA TGG AAC TGG ATT TGG-3'

TAP2 posición 379

Primer 1 5'-TTG GAG GGC TGC AGA CCG TTC GCA GTT TTG-3'
Primer 2 5'-GAG ACC TGG AAC GCG CCT TGT ACC TGC GCG-3'
Primer 3 5'-ACA ACC ACT CTG GTA TCT TAC CCT CCT GAT-3'
Primer 4 5'-ACA TAG CTC CCC ACG CTC TCC TGG TAG ATC-3'

TAP2 posición 565

Primer 1 5'-CTC ACA GTA TGA ACA CTG CTA CCT GCA CAG-3'
Primer 2 5'-TGT TCT CCG GTT CTG TGA GGA ACA ACA GTA-3'
Primer 3 5'-ATC ATC TTC GCA GCT CTG CAG CCC ATA AAC-3'
Primer 4 5'-GGA GCA AGC TTA CAA TTT GTA GAA GAT ACC-3'

TAP2 posición 665

Primer 1 5'-TTG GGG AAT GGA ATC CGG TGG TGT GAG GGC-3'
Primer 2 5'-CAG TGC TGG TGA TTG CTC ACA GGC TGC AAA-3'
Primer 3 5'-CAC CAG GAT CTG GTG GGC GCG CTG AAC TAC-3'
Primer 4 5'-TCA GCC GCT GCT GCA CCA GGC GGG AAT AGA-3'

5. Fotografiar el gel.
6. Informar los resultados obtenidos.
7. Una vez que se tienen los datos de todos los individuos, se efectúa la comparación estadística entre los grupos de estudio.

4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Con los resultados obtenidos de la genotipificación se calculó:

FA frecuencia antigénica: es la proporción de sujetos del total, que son portadores de un determinado antígeno. Esta se calcula en porcentaje.

$$FA = \frac{A}{n} * 100$$

A= numero de sujetos portadores del antígeno.

n= numero total de individuos.

FG frecuencia génica, la cual se calcula a partir de la FA mediante la fórmula de Haldane, su valor se reporta en números absolutos.

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

La comparación de las frecuencias entre dos poblaciones diferentes se efectuó con los siguientes cálculos:

La significancia estadística de una probable asociación HLA, es decir que un antígeno se encuentre significativamente elevado (sugiriendo susceptibilidad asociada a HLA) o significativamente disminuido (sugiriendo protección) en los enfermos comparativamente con los testigos, se calcula mediante la prueba de chi cuadrada con corrección de Yates ($\chi^2 Y$) ya que dicha corrección es necesaria cuando el tamaño de la muestra es pequeño pues es más estricta y por lo tanto la significancia estadística es más real.

Se emplea una tabla de 2x2 como se muestra a continuación:

	Con el alelo	Sin el alelo	Total
No. Pacientes	a	b	a+c
No. Testigos	c	d	c+d
Total	a+c	b+d	N=a+b+c+d

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

Esta fórmula también fue empleada para determinar las diferencias significativas existentes entre los seris y mestizos

Una vez que se tiene la χ^2 , se busca el valor de la probabilidad (p) en las tablas de estadística tomando en cuenta que el número de grados de libertad es N-1. Es decir que si se comparan dos poblaciones para un antígeno, el grado de libertad es 1.

Alternativamente se puede usar la prueba exacta de Fisher (pf) que es conveniente en los casos en los que alguno de los valores de la tabla 2x2 sea muy pequeño (en general menor de 5).

$$pf = \frac{(a + b)! (a + c)! (b + d)! (c + d)!}{n! a! b! c! d!}$$

Una vez que se ha demostrado que un antígeno está incrementado o disminuído significativamente en alguno de los padecimientos, se calcula lo siguiente:

RRH Riesgo relativo según Haldane, el cual es una estimación de la intensidad de la asociación e indica cuantas veces más riesgo de desarrollar la enfermedad tiene un individuo portador del antígeno en cuestión.

$$RRH = \frac{(2a + 1)(2d + 1)}{(2b + 1)(2c + 1)}$$

FE Fracción etiológica, es una medida relativa de cuanto de la asociación se debe al marcador en cuestión. Mientras más se acerca el valor a 1, más se debe la enfermedad al marcador.

$$FE = \frac{RR - 1}{RR} \times \frac{a}{a + b}$$

FP fracción preventiva, es también una medida relativa que indica cuanto de la protección se debe al marcador, en los casos en los que se encuentra un antígeno significativamente disminuido en la enfermedad.

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

FH frecuencia haplotípica, se calcula directamente, y es la proporción del total de sujetos que presentan determinado haplotipo.

$$FH = \frac{Hx}{n} * 100$$

Hx=numero de ocurrencia del haplotipo x

n=numero total de haplotipos.

Formulas obtenidas de: "Métodos para el análisis estadístico del HLA"⁹⁴.

D desequilibrio de enlace, indica que existe una asociación preferencial entre alelos de diferentes loci. En condiciones de equilibrio genético, un alelo debe tener la misma probabilidad de encontrarse en combinación con cualquier otro alelo de uno o varios loci en el mismo individuo, pero en el sistema HLA existen asociaciones o desequilibrios preferenciales.

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

Siendo "n" igual al número de individuos que se analizan, y a, b, c y d, el número de individuos observados en los siguientes casos:

Fenotipos

<u>Alelo A</u>	<u>Alelo B</u>	
+	+	a
+	-	b
-	+	c
-	-	d

Formulas tomadas de P.L. Mattiuz, D. Ihde, y col.⁹⁵.

VIII. RESULTADOS

Los resultados obtenidos en este trabajo se distribuyeron de la siguiente forma:

En el Cuadro 7, se muestran las frecuencias obtenidas en el grupo de población general mestiza, que sirvieron de base para comparar con las frecuencias obtenidas en cada uno de los demás grupos incluidos. El alelo más frecuente en mestizos para el locus TAP1 es el TAP1A (66.12%), mientras que el alelo TAP1C está ausente. Algo muy interesante es la presencia de TAP1D ya que se describió muy recientemente en otros grupos en frecuencias muy bajas y anteriormente sólo se había descrito matemáticamente. Para TAP2 el alelo que se encuentra con mayor frecuencia es TAP2A (53.2 %) seguido de el alelo TAP2B (31.75%). Están ausentes los alelos TAP2F y TAP2G y los demás están presentes en frecuencias menores del 5%.

En el mismo cuadro se compararon las frecuencias de los mestizos con las de los indios seris. Las diferencias que se observan entre estas dos poblaciones son el alelo TAP1B que se encuentra con una mayor frecuencia en los seris (29.27%) con respecto a los mestizos (5.91%) ($pf=0.006$), mientras que TAP1D no existe en los seris y en mestizos tiene una frecuencia (5.91%) ($pc=0.002$). Otra diferencia es el ligero incremento en los seris de TAP 1A ($pc=0.023$). En cuanto al locus TAP2 el alelo TAP2A está muy significativamente incrementado en los mestizos (53.18%) con respecto a los seris (39.02%) con una $pc=0.000003$. Otra diferencia significativa radica en el alelo TAP2D que se halla incrementado en los seris (8.54% vs 0.69% $pf= 0.04$). Estos datos se esquematizan claramente en la Gráfica 1 y en la Gráfica 2, en las que se comparan las frecuencias de los alelos de TAP en las dos poblaciones y se indican los alelos que resultaron significativamente diferentes. Se armaron los haplotipos HLA DRB1*DQA1*DQB1*TAP1*TAP2* de los mestizos los cuales se muestran en el Cuadro 8, para lo cual se utilizaron los datos obtenidos de la tipificación de clase II previamente realizada por Carmen Alaez en el laboratorio de Biología Molecular del mismo Departamento de Inmunogenética. En este cuadro se observa claramente que los alelos TAP aumentan el número de haplotipos en la población de 17 hasta 24. Este se comparó con los haplotipos obtenidos de 41

seris pertenecientes a 23 familias. Estos se esquematizan en el Cuadro 9, en donde de 5 haplotipos iniciales, al introducir la información obtenida de TAP, estos aumentan a 17. En el Cuadro 10 se analizan que haplotipos comparten los mestizos y los seris. Sólo hay 1 diferencia significativa en su distribución, expresada en el haplotipo DRB1*0701-DQA1*0201-DQB1*0201-TAP*1A-TAP*2A el cual está en el límite de la significancia.

En el Cuadro 11 se muestra el análisis por aminoácidos entre seris y mestizos.

Del Cuadro 12 al Cuadro 15 se presenta la distribución de los alelos TAP en las enfermedades autoinmunes incluídas en el estudio: DMDI, AR, FR, VKH, cuyas frecuencias se comparan con el grupo de sujetos sanos que corresponden a la población mestiza. No se encontró ninguna desviación significativa en la distribución alélica de las enfermedades con respecto a los sanos, excepto en DMDI en donde el alelo TAP1D está ausente y en los sanos tiene una frecuencia del 5.9% ($p=0.014$), y en CR, donde está disminuído el alelo TAP1B, diferencia que se vuelve no significativa al corregir el valor de p .

En las gráficas 3 y 4, se esquematizan los datos y se observa que para el caso de TAP1, los alelos más frecuentes son el alelo 1A para todas los grupos de estudio, incluyendo a los sanos; y en el caso de TAP2, los alelos más frecuentes son el 2A y 2B en menor proporción.

Del Cuadro 16 al Cuadro 19, se presenta el análisis por aminoácidos para cada una de las enfermedades. En el Cuadro 16, observamos que hay un incremento de homocigotos para treonina en la posición 665 de TAP2 en la DMDI.

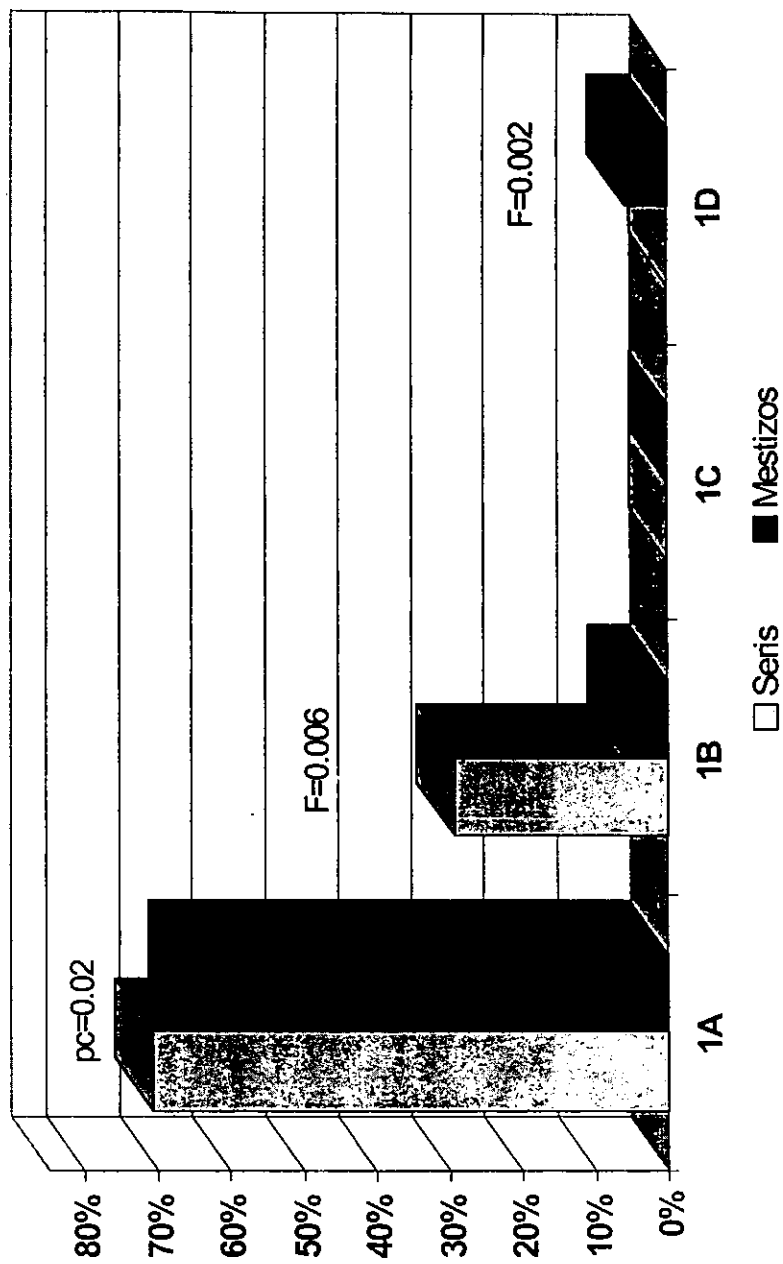
El análisis por aminoácidos para artritis, no muestra ninguna diferencia significativa, sin embargo para la cardiopatía reumática (Cuadro 18), existe un incremento significativo para el caso de la glicina en la posición 637 de TAP1, pues ningún paciente con cardiopatía reumática presenta este aminoácido en dicha posición teniendo un valor de significancia $p=0.02$ la cual se pierde al corregir el valor de p , al multiplicar por el número combinaciones posibles. Finalmente, no se observó ninguna diferencia para el síndrome de VKH. En el Cuadro 20 se resumen los hallazgos encontrados para TAP en mexicanos. En el Cuadro 21 se presenta el análisis de estratificación de la Thr/665 en presencia y ausencia del DRB1*0405 y del DQB1*0302, en el Cuadro 22 se presenta el cálculo del desequilibrio de enlace entre estos mismos alelos, y finalmente en el Cuadro 23 se presentan las frecuencias haplotípicas de Thr/665-DRB1*0405 y de Thr/665-DQB1*0302.

Cuadro 7: Distribución de las frecuencias de los alelos de TAP1 y TAP2 en seris

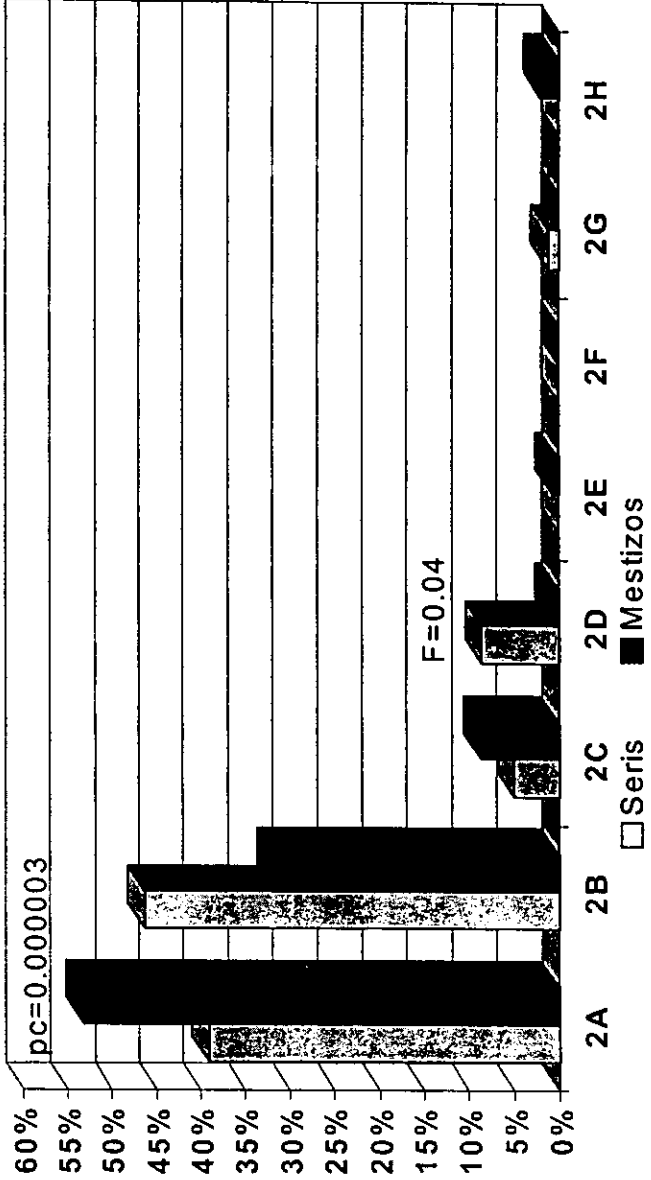
TAP1	Seris		Mestizos					x ² Y	p	pc
	82	82	FA(%)	FG(%)	n=61	FA(%)	FG(%)			
1A	58	58	95.6	70.73	54	88.52	66.12	7.61	0.006	0.02
1B	24	24	50.0	29.27	7	11.48	5.91	5.51	0.02	*0.006
1C	0	0	0.0	0.0	0	0.00	0.00			
1D	0	0	0.0	0.0	7	11.48	5.91	12.51	0.0004	0.002
TAP2	82	82			n=73					
2A	32	32	56.52	39.02	57	78.08	53.18	25.72	0.0000004	0.000003
2B	38	38	63.0	46.34	39	53.42	31.75	1.08		*0.08
2C	4	4	6.5	4.88	12	16.44	8.59	6.89		NS
2D	7	7	15.2	8.54	1	1.37	0.69	2.72	0.009	*0.04
2E	1	1	0.00	0.00	1	1.37	0.69	0.63		NS
2F	0	0	0.00	0.00	0	0.00	0.00			NS
2G	0	0	2.1	1.22	0	0.00	0.00			NS
2H	0	0	0.00	0.00	3	4.11	2.08	5.9426	0.01	NS

FA= Frecuencia antigénica, FG= Frecuencia génica, X²Y= chi cuadrada con corrección de Yates, p= significancia estadística, NS= no significativo, *fisher

Gráfica 1: Distribución de las frecuencias génicas de los alelos TAP1 en mestizos y seris



Gráfica 2: Distribución de las frecuencias génicas de los alelos TAP2 en mestizos y seris



Cuadro 8: Frecuencias haplotípicas de clase II en mestizos

DRB1*	DQA1*	DQB1*	TAP1	TAP2	N=18	FH (%)	FP (%)
0407	03011	0302	1A	2A	2	5.56	11.11
0407	03011	0302	1A	2B	1	2.78	5.56
0802	0401	0402	1A	2A	5	<u>13.89</u>	<u>27.78</u>
0802	0401	0402	1A	2B	1	2.78	5.56
0802	0401	0402	1A	2C	1	2.78	5.56
1402	0501	0301	1A	2A	1	2.78	5.56
1402	0501	0301	1A	2B	1	2.78	5.56
>11	0102	0502	1A	2B	1	2.78	5.56
>1101	0501	0301	1A	2A	2	5.56	11.11
>0101	0101/4	0501	1A	2B	1	2.78	5.56
>0102	0101/4	0501	1A	2B	1	2.78	5.56
>0102	0101/4	0501	1B	2A	1	2.78	5.56
>0102	0101/4	0501	1A	2A	1	2.78	5.56
>0411	03011	0302	1A	2A	2	5.56	11.11
>0701	0201	0201	1A	2A	4	<u>11.11</u>	<u>22.22</u>
>0405	03011	0302	1A	2A	1	2.78	5.56
>03011	0501	0201	1A	2A	1	2.78	5.56
>1501	0102	0602	1A	2A	2	5.56	11.11
>1406	0501	0301	1A	2C	1	2.78	5.56
>1406	0501	0301	1A	2D	1	2.78	5.56
>1601	0102	0502	1A	2A	1	2.78	5.56
>0901	03011	0201	1A	2A	1	2.78	5.56
>1602	0501	0301	1B	2A	1	2.78	5.56
>0404	03011	0302	1A	2A	2	5.56	11.11

>Ausentes en Seris; FH= Frecuencia Haplotípica; FP= Frecuencia en la población

Cuadro 9: Frecuencias haplotípicas en seris

No. FAM=23				HAPLOTIPOS		
DRB1* DQA1* DQB1* TAP1* TAP2*		N=41	FH%	FP%		
0407 03011 0302 1A 2A		16	19.5	39.0		
0407 03011 0302 1A 2B		13	15.9	31.7		
>0407 03011 0302 1A 2D		2	2.4	4.9		
>0407 03011 0302 1B 2B		2	2.4	4.9		
>0407 03011 0302 1A 2C		2	2.4	4.9		
0802 0401 0402 1A 2A		7	8.5	17.1		
0802 0401 0402 1B 2B		19	23.2	46.3		
>0802 0401 0402 1B 2G		1	1.2	2.4		
0802 0401 0402 1A 2B		1	1.2	2.4		
>0802 0401 0402 1B 2A		1	1.2	2.4		
1402 0501 0301 1A 2A		4	4.9	9.8		
1402 0501 0301 1A 2B		2	2.4	4.9		
>1402 0501 0301 1A 2C		2	2.4	4.9		
>1402 0501 0301 1A 2D		5	6.1	12.2		
>1402 0501 0301 1B 2A		1	1.2	2.4		
0701 0201 0201 1A 2A		3	3.7	7.3		
1100 0501 0301 1A 2B		1	1.2	2.4		

> Ausentes en mestizos; FH= Frecuencia Haplotipos; N= # Haplotipos

Cuadro 10: Análisis estadístico de los haplotipos compartidos entre seris y mestizos

DRB1*	DQA1*	DQB1*	TAPI	TAP2	Seris		Mestizos		P
					FH	FP	FH	FP	
0407	3011	0302	1A	2A	<u>19.5</u>	<u>39.0</u>	5.6	11.11	NS
0407	3011	0302	1A	2B	<u>15.9</u>	<u>31.7</u>	2.8	5.56	NS
0802	0401	0402	1A	2A	8.5	17.1	<u>13.9</u>	<u>27.78</u>	NS
0802	0401	0402	1A	2B	1.2	2.4	2.8	5.56	NS
1402	0501	0301	1A	2A	4.9	9.8	2.8	5.56	NS
1402	0501	0301	1A	2B	2.4	4.9	2.8	5.56	NS
11	0102	0502	1A	2B	1.2	2.4	2.8	5.56	NS
0701	0201	0201	1A	2A	3.7	7.3	<u>11.1</u>	<u>22.22</u>	0.05

FH= frecuencia haplotípica, FP= frecuencia en la población

Cuadro 11: Análisis por aminoácidos entre seris y mestizos

		Seris		Mestizos		Xi ² Y	P
		n=97	%	n=87	%		
T	333						
	ILE	49	50.52	54	62.07	2.97	NS
	VAL	4	4.12	2	2.30	0.07	NS
	VAL/ILE	44	45.36	31	35.63	1.41	NS
A	ILE	142	73.20	139	79.89	2.65	NS
	VAL	52	26.80	35	20.11	1.91	NS
P	637	99		88			
	ASP	50	50.51	52	59.09	1.75	NS
	GLY	4	4.04	8	9.09	2.90	NS
	ASP/GLY	45	45.45	28	31.82	3.08	NS
	ASP	145	73.23	132	75.00	0.25	NS
	GLY	53	26.77	44	25.00	0.07	NS
T	379	98		85			
	VAL	77	78.57	62	72.94	0.51	NS
	ILE	2	2.04	3	3.53	1.14	NS
	VAL/ILE	19	19.39	20	23.53	0.74	NS
	VAL	173	88.27	144	84.71	0.71	NS
	ILE	23	11.73	26	15.29	1.32	NS
T	565	99		88			
	ALA	85	85.86	76	86.36	0.09	NS
	THR	1	1.01	0	0.00	0.003	NS
A	ALA/THR	13	13.13	12	13.64	0.1	NS
	ALA	183	92.42	164	93.18	0.23	NS
P	THR	15	7.65	12	6.90	0.007	NS
	665	98		87			
	ALA	25	25.51	13	14.94	2.53	
	THR	29	29.59	37	42.53	3.94	0.05
	ALA/THR	44	44.90	35	40.23	0.24	
	ALA	94	47.96	63	36.21	4.74	0.03
	THR	102	52.04	111	63.79	5.70	0.02

Cuadro 12: Distribución de las frecuencias génicas de los genes TAP1 y TAP2 en diabetes tipo I

TAP1	DMDI		SANOS				x ² Y	p	Pc	RR H
	n=52	FA (%)	FG (%)	n=61	FA (%)	FG (%)				
1A	48	92.31	72.26	54	88.52	66.12	0.12			
1B	4	7.69	3.92	7	11.48	5.91	0.98			
1C	2	3.85	1.94	0	0.00	0.00	0.68			
1D	0	0.00	0.00	7	11.48	5.91	8.48	0.003	0.014	0.07
TAP2	n=64			n=73						
2A	59	92.19	72.05	57	78.08	53.18	4.19	0.04	NS	
2B	21	32.81	18.03	39	53.42	31.75	6.75	0.009	NS	
2C	11	17.19	9.00	12	16.44	8.59	0.01			
2D	0	0.00	0.00	1	1.37	0.69	3.78			
2E	0	0.00	0.00	1	1.37	0.69	3.78			
2F	0	0.00	0.00	0	0.00	0.00				
2G	0	0.00	0.00	0	0.00	0.00				
2H	0	0.00	0.00	3	4.11	2.08	4.95	0.026	NS	

FA=frecuencia antigénica, FG=frecuencia génica, NS=no significativo

Cuadro 13: Distribución de las frecuencias génicas de los genes TAP1 y TAP2 en artritis reumatoide

AR		SANOS					χ^2Y	P
TAP1	n=34	FA (%)	FG (%)	n=61	FA (%)	FG (%)		
1A	33	97.06	82.85	54	88.52	66.12	1.10	NS
1B	1	2.94	1.48	7	11.48	5.91	3.31	NS
1C	0	0.00	0.00	0	0.00	0.00	---	NS
1D	6	17.65	9.25	7	11.48	5.91	0.27	NS
TAP2		n=41		n=73				P
2A	31	75.61	50.61	57	78.08	53.18	0.28	NS
2B	25	60.98	37.53	39	53.42	31.75	0.34	NS
2C	5	12.20	6.30	12	16.44	8.59	0.78	NS
2D	1	2.44	1.23	1	1.37	0.69	0.10	NS
2E	0	0.00	0.00	1	1.37	0.69	3.23	NS
2F	0	0.00	0.00	0	0.00	0.00	---	NS
2G	0	0.00	0.00	0	0.00	0.00	---	NS
2H	1	2.44	1.23	3	4.11	2.08	0.99	NS

FA=frecuencia antigénica, FG=frecuencia génica, NS=no significativo

Cuadro 14: Distribución de las frecuencias génicas de los genes TAP1 y TAP2 en cardiopatía reumática

		CONTROLES							
FR		n=24	FA (%)	FG (%)	n=61	FA (%)	FG (%)	x ² Y	p
TAP1	1A	24	100.00	100.00	54	88.52	66.12	1.67	NS
	1B	0	0.00	0.00	7	11.48	5.91	4.71	0.03
	1C	0	0.00	0.00	0	0.00	0.00	---	NS
	1D	4	16.67	8.71	7	11.48	5.91	0.08	NS
TAP2		n=30			n=73				
	2A	23	76.67	51.70	57	78.08	53.18	0.17	NS
	2B	18	60.00	36.75	39	53.42	31.75	0.15	NS
	2C	4	13.33	6.91	12	16.44	8.59	0.48	NS
	2D	1	3.33	1.68	1	1.37	0.69	0.01	NS
	2E	0	0.00	0.00	1	1.37	0.69	3.06	NS
	2F	0	0.00	0.00	0	0.00	0.00	---	NS
	2G	0	0.00	0.00	0	0.00	0.00	---	NS
	2H	0	0.00	0.00	3	4.11	2.08	3.13	NS

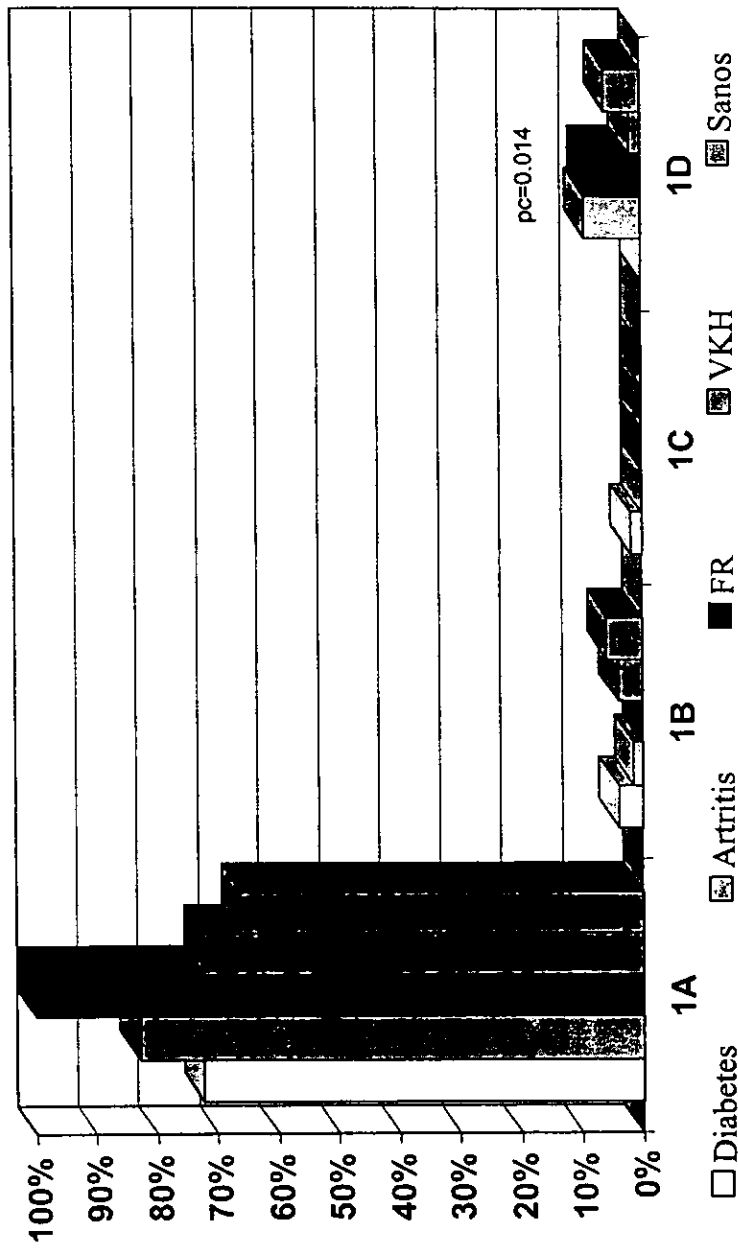
FA=frecuencia antigénica, FG=frecuencia génica, NS=no significativo

Cuadro 15: Distribución de las frecuencias génicas de los genes TAP1 y TAP2 en síndrome de VKH

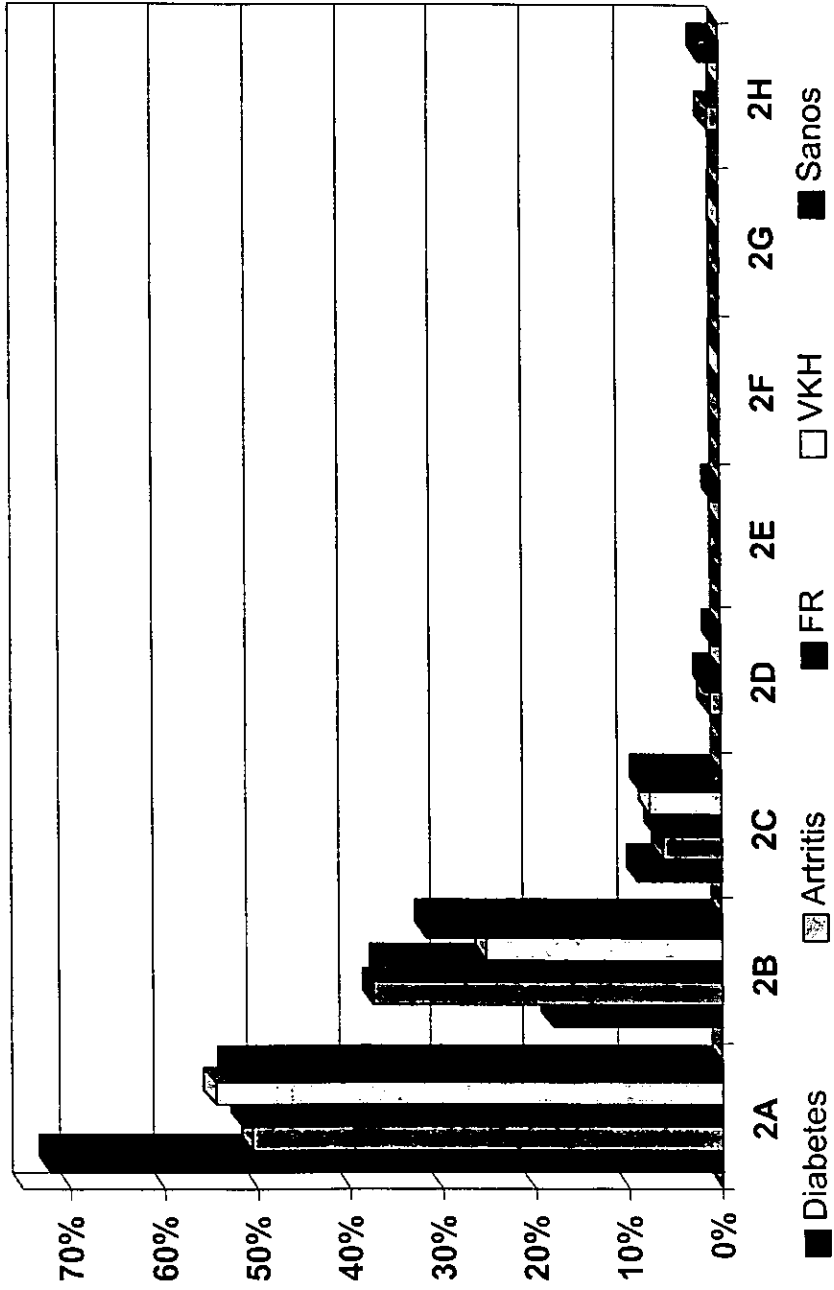
		VKH				SANOS					
TAP1		n=26	FA (%)	FG (%)	n=61	FA (%)	FG (%)	x ² Y	p		
1A	24	92.31	72.26	54	88.52	66.12	0.02	NS			
1B	2	7.69	3.92	7	11.48	5.91	0.83	NS			
1C	0	0.00	0.00	0	0.00	0.00		NS			
1D	1	3.85	1.94	7	11.48	5.91	2.34	NS			
TAP2		n=34			n=73						
2A	27	79.41	54.63	57	78.08	53.18	0.009	NS			
2B	15	44.12	25.25	39	53.42	31.75	1.21	NS			
2C	5	14.71	7.65	12	16.44	8.59	0.26	NS			
2D	0	0.00	0.00	1	1.37	0.69	3.11	NS			
2E	0	0.00	0.00	1	1.37	0.69	3.11	NS			
2F	0	0.00	0.00	0	0.00	0.00		NS			
2G	0	0.00	0.00	0	0.00	0.00		NS			
2H	0	0.00	0.00	3	4.11	2.08	3.34	NS			

FA=frecuencia antigénica, FG=frecuencia génica, NS=no significativo

Gráfica 3: Distribución de las frecuencias génicas de TAP1 en autoinmunidad



Gráfica 4: Distribución de las frecuencias génicas de TAP2 en autoinmunidad



Cuadro 16: Análisis por aminoácidos en diabetes tipo I

		Diabetes		Sanos		$\chi^2 Y$	p	RR H	FE	FP
T	333	66	%	87	%					
	ILE	46	69.70	54	62.07	0.65	NS			
	VAL	4	6.06	2	2.30	0.58	NS			
	VAL/ILE	16	24.24	31	35.63	2.85	NS			
A	ILE	108	81.82	139	79.89	0.07	NS			
	VAL	24	18.18	35	20.11	0.32	NS			
P	637	66		88						
	ASP	48	72.73	52	59.09	2.51	NS			
	GLY	4	6.06	8	9.09	0.99	NS			
	ASP/GLY	14	21.21	28	31.82	2.70	NS			
	ASP	110	83.33	132	75.00	2.63	NS			
	GLY	22	16.67	44	25.00	3.62	NS			
T	379	66		85						
	VAL	53	80.30	62	72.94	0.74	NS			
	ILE	1	1.52	3	3.53	1.62	NS			
	VAL/ILE	12	18.18	20	23.53	0.99	NS			
	VAL	118	89.39	144	84.71	1.04	NS			
	ILE	14	10.61	26	15.29	1.85	NS			
A	565	66		88						
	ALA	63	95.45	76	86.36	2.58				
	THR	0	0.00	0	0.00					
	ALA/THR	3	4.55	12	13.64	4.65	0.0310	0.3373		0.08
P	ALA	129	97.73	164	93.18	2.45				
	THR	3	2.27	12	6.90	4.41	0.0356	0.3557		0.03
T	665	66		87						
	ALA	4	6.06	13	14.94	3.96	0.0465	0.3973		0.08
	THR	44	66.67	37	42.53	7.83	0.0051	2.6634	0.41	
	ALA/THR	18	27.27	35	40.23	3.38				
	ALA	26	19.70	63	36.21	10.73	0.0011	0.4369		0.2
	THR	106	80.30	111	63.79	9.13	0.0025	2.2888	0.45	

RR=riesgo relativo, FE=fracción etiológica, FP=fracción preventiva

Cuadro 17: Análisis por aminoácidos en artritis

		Artritis		Sanos		x ² Y	P
T	333	47		87			
	ILE	33	70.21	54	62.07	0.56	NS
	VAL	0	0.00	2	2.30	3.21	NS
	VAL/ILE	14	29.79	31	35.63	0.76	NS
A	ILE	80	85.11	139	79.89	0.79	NS
	VAL	14	14.89	35	20.11	1.49	NS
P	637	47		88			
	ASP	28	59.57	52	59.09	0.01	NS
1	GLY	1	2.13	8	9.09	3.63	NS
	ASP/GLY	18	38.30	28	31.82	0.32	NS
	ASP	74	78.72	132	75.00	0.28	NS
	GLY	20	21.28	44	25.00	0.69	NS
T	379	47		85			
	VAL	37	78.72	62	72.94	0.27	NS
	ILE	2	4.26	3	3.53	0.07	NS
	VAL/ILE	8	17.02	20	23.53	1.20	NS
A	VAL	82	87.23	144	84.71	0.14	NS
	ILE	12	12.77	26	15.29	0.55	NS
P	565	47		88			
	ALA	43	91.49	76	86.36	0.35	NS
2	THR	0	0.00	0	0.00		NS
	ALA/THR	4	8.51	12	13.64	1.33	NS
P	ALA	90	95.74	164	93.18	0.33	NS
	THR	4	4.35	12	6.90	1.25	NS
T	665	46		87			
	ALA	8	17.39	13	14.94	0.01	NS
	THR	17	36.96	37	42.53	0.65	NS
	ALA/THR	21	45.65	35	40.23	0.17	NS
A	ALA	37	40.22	63	36.21	0.25	NS
	THR	55	59.78	111	63.79	0.60	NS

RR=riesgo relativo, FE=fracción etiológica, FP=fracción preventiva

Cuadro 18: Análisis por aminoácidos en cardiopatía reumática

		FIEBRE REUMATICA		Sanos	χ^2	P	
T	333	37		87			
	ILE	24	64.86	54	62.07	0.00	NS
	VAL	0	0.00	2	2.30	2.92	NS
	VAL/ILE	13	35.14	31	35.63	0.06	NS
A	ILE	61	82.43	139	79.89	0.08	NS
	VAL	13	17.57	35	20.11	0.40	NS
P	637	37		88			
	ASP	20	54.05	52	59.09	0.51	NS
	GLY	0	0.00	8	9.09	5.27	0.0217
	ASP/GLY	17	45.95	28	31.82	1.68	NS
	ASP	57	77.03	132	75.00	0.03	NS
	GLY	17	22.97	44	25.00	0.25	NS
T	379	36		85			
	VAL	29	80.56	62	72.94	0.43	NS
	ILE	2	5.56	3	3.53	0.00	NS
	VAL/ILE	5	13.89	20	23.53	2.08	NS
	VAL	63	87.50	144	84.71	0.13	NS
	ILE	9	12.50	26	15.29	0.58	NS
A	565	37		88			
	ALA	35	94.59	76	86.36	1.04	NS
	THR	0	0.00	0	0.00		NS
	ALA/THR	2	5.41	12	13.64	2.69	NS
P	ALA	72	97.30	164	93.18	0.98	NS
	THR	2	3.13	12	6.90	2.53	NS
2	665	32		87			
	ALA	5	15.63	13	14.94	0.03	NS
	THR	13	40.63	37	42.53	0.15	NS
	ALA/THR	14	43.75	35	40.23	0.01	NS
	ALA	24	37.50	63	36.21	0.00	NS
	THR	40	62.50	111	63.79	0.11	NS

RR=riesgo relativo, FE=fracción etiológica, FP=fracción preventiva

Cuadro 19: Análisis por aminoácidos en VKH

		VKH	Controles	$\chi^2 Y$	P		
	333	43	87				
T	ILE	24	55.81	54	62.07	0.76	NS
	VAL	2	4.65	2	2.30	0.03	NS
	VAL/ILE	17	39.53	31	35.63	0.05	NS
A	ILE	65	75.58	139	79.89	0.91	NS
	VAL	21	24.42	35	20.11	0.40	NS
P							
1	637	43		88			
	ASP	23	53.49	52	59.09	0.63	NS
	GLY	2	4.65	8	9.09	1.55	NS
	ASP/GLY	18	41.86	28	31.82	0.87	NS
	ASP	64	74.42	132	75.00	0.06	NS
	GLY	22	25.58	44	25.00	0.00	NS
	379	42		85			
	VAL	30	71.43	62	72.94	0.15	NS
	ILE	0	0.00	3	3.53	3.43	NS
	VAL/ILE	12	28.57	20	23.53	0.15	NS
	VAL	72	85.71	144	84.71	0.00	NS
	ILE	12	14.29	26	15.29	0.15	NS
T							
A	565	42		88			
	ALA	33	78.57	76	86.36	1.91	NS
	THR	0	0.00	0	0.00		NS
ALA/THR	5	11.90	12	13.64	0.30	NS	
P							
2	ALA	79	94.05	164	93.18	0.00	NS
	THR	5	6.10	12	6.90	0.28	NS
	665	41		87			
	ALA	7	17.07	13	14.94	0.00	NS
	THR	20	48.78	37	42.53	0.22	NS
	ALA/THR	14	34.15	35	40.23	0.73	NS
	ALA	28	34.15	63	36.21	0.21	NS
	THR	54	65.85	111	63.79	0.03	NS

RR=riesgo relativo, FE=fracción etiológica, FP=fracción preventiva

Cuadro 20: Resumen de los hallazgos encontrados de TAP en población mexicana

	Alelo	p	Análisis por aminoácidos
DMDI	↓ TAP1D	p=0.003	↑ homocigotos Thr/665
	↓ TAP2B	p=0.009	p=0.005
Artritis reumatoide	no asociación		no asociación
Cardiopatía reumática	↓ TAP 1B	p=0.02	↓ homocigotos Gly/637
		pc=0.08	p=0.02, pc=0.06
Síndrome de Vogt	no		no asociación
Koyanagi Harada	asociación		

Cuadro 21: Análisis para la presencia de Thr/665/TAP2 en DMDI y sanos, excluyendo al DRB1*0405 y al DQB1*0302

	DMDI		Sanos				
665	66	%	87	%	x²Y	RR H	p
ALA	4	6.06	13	14.94	3.96	0.39	0.05
THR	44	66.67	37	42.53	7.83	2.66	0.005
ALA/THR	18	27.27	35	40.23	3.38		
	sin DRB1*0405		sin DRB1*0405				
665	51	%	84	%			
ALA	3	6	13	15.5	3.78		NS
THR	33	65	35	41.5	5.84	2.52	0.015
ALA/THR	15	29	36	43	3.04		NS
	sin DQB1*0302		sin DQB1*0302				
665	15	%	66	%	x²Y		p
ALA	1	6.5	10	15	1.64		NS
THR	8	53.5	27	41	0.34		NS
ALA/THR	6	40	29	44	0.32		NS

Cuadro 22: Cálculo del desequilibrio de enlace entre Tre665 y DRB1*0405 y DQB1*0302

Elementos de la fórmula	<u>DRB1*0405</u>		<u>DQB1*0302</u>	
	Sanos	Diabetes tipo I	Sanos	Diabetes tipo I
a	2	12	10	41
b	59	84	43	55
c	0	4	3	7
d	22	32	13	9
n	83	132	69	112
p	NS	NS	NS	NS
Δ thr665/	0.0062	0.002	0.00024	-0.002

Para asignación de a, b, c, y d, revisar VII.4(p58)

Cuadro 23: Comparación de las frecuencias haplotípicas de Thr/665-DRB1*0405 y Thr/665-DQB1*0302 en DMDI y sanos

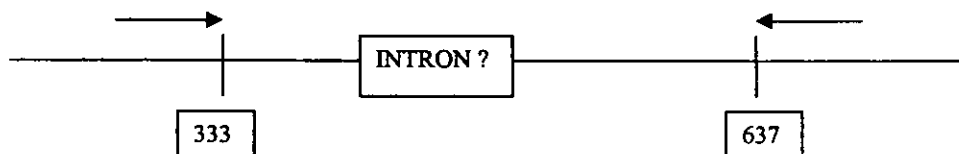
HAPLOTIPO	FH		X ² Y	p
	DMDI (%)	Sanos(%)		
Thr665/DRB1 *0405	9	2.4	2.7197	0.09
Thr665/DQB1 *0302	36.5	14.5	9.2539	0.002

ESTA TESIS NO DEBE
QUEDAR EN LA BIBLIOTECA

IX. DISCUSIÓN

La genotipificación de TAP es un área novedosa que data de apenas algunos años y se han descrito varias técnicas moleculares para su análisis³⁶. Entre ellas están la PCR-SSO en la cual después de efectuar una amplificación de la región transmembranal y citoplásmica, donde se localiza el polimorfismo de cada locus, el producto de PCR se siembra en una membrana de nylon cargada positivamente, que se enfrenta a seis oligonucleótidos secuencia específicos (SSO) para la determinación de los alelos de TAP2 y cuatro SSO para la caracterización de los alelos de TAP1 (S44, S41). El método es muy laborioso y consume mucho tiempo debido a que se requieren lavados múltiples de las membranas, las temperaturas de incubación son variadas y el número de sondas e iniciadores a utilizar es mayor^{48,50}. Otro método que se emplea es la PCR-RFLP⁹⁶ (amplificación y tipificación mediante el uso de polimorfismos de restricción de longitud variable), en donde para TAP1, se amplifica una región que comprenda a la posición 333 y en otra reacción se amplifica a la 637. Cada uno de los productos de amplificación se someten a restricción enzimática, empleando dos enzimas para la posición 333 y otras 2 para la 637, lo que permite reconocer a cada uno de los alelos. En el caso de TAP2 se efectúa una sola amplificación que comprenda la posición 379 y a la 565. Este producto se somete a restricción con 4 diferentes enzimas; en otra reacción se amplifica la región 665 y 687 cuyo producto se digiere separadamente con 4 enzimas diferentes para conocer las respectivas variantes. Esta técnica es costosa y consume mucho tiempo por la gran cantidad de enzimas que se requieren. PCR-ARMS, es la técnica más ventajosa porque permite la genotipificación rápida del micropolimorfismo de TAP, ya que bastan dos amplificaciones para TAP1 y tres para TAP2, para conocer inmediatamente los alelos de un individuo. No obstante tiene algunas desventajas, ya que en individuos heterocigotos no permite asignar los alelos, pues si un individuo tiene val/ile en la posición 333, y en la posición 637 asp/gly, no se puede saber si la val va con el asp y la ile con la gly. El individuo podría ser TAP 1C/1D o bien, si la ile esta en el mismo cromosoma con el asp y la val con la gly, se trataría de un individuo TAP1A/1B. Asignaciones de esta naturaleza quedaron excluidos del análisis por alelos, para evitar interpretaciones erróneas. En algunos

trabajos han asignado los alelos, basándose en los que son más frecuentes en su población, lo que de todos modos no da más que una aproximación y de ninguna manera una tipificación certera. Siguiendo con el ejemplo planteado, un individuo ambiguo TAP 1A/1B o 1C/1D sería TAP 1A/1B puesto que estos son los alelos que se encontraron como más frecuentes en la población estudiada, y los alelos TAP 1C/1D son muy poco frecuentes, sin embargo es preferible no hacerlo, ya que aunque después del estudio, conocemos cuales son los alelos más frecuentes, esto no asegura que los individuos heterocigotos sean portadores precisamente de esos alelos. Lo más objetivo es tratar de desarrollar alguna estrategia que permita la asignación alélica correcta. Para estudios futuros estamos diseñando efectuar una PCR larga para los individuos heterocigotos a más de dos posiciones polimórficas de TAP, en la cual se amplifique un fragmento que incluya ambas posiciones dimórficas utilizando los iniciadores cuyos extremos 3' son complementarios a las variantes de la posición dimórfica. En el mismo ejemplo, se usaría el iniciador 2 de la posición 333 en combinación con el iniciador 3 de la posición 637, como se muestra a continuación:



En este caso sólo se observa amplificación cuando el individuo sea 1D en alguno de sus cromosomas por lo que entonces este individuo heterocigoto indefinido finalmente es 1C/1D. Debe incluirse dos tipos de controles: uno, en cada amplificación a un individuo 1D que funcione como control externo de amplificación, y dos: algún control interno, como el producido por los iniciadores C3 y C5⁹⁷ complementarios a una región constante del DRB1, que da lugar a un producto de amplificación de 796 pb que incluye parte del tercer intrón, y parte del cuarto exón.

Se están efectuando ya los ensayos para aplicar esta metodología, pero aún no se consigue amplificar este fragmento cuyo tamaño desconocemos, ya que como se muestra en el diagrama, entre ambas posiciones se encuentra un intrón. Como las secuencias conocidas para TAP son a partir de cDNA, se tendrá que secuenciar para definir con precisión el tamaño de los fragmentos.

Con respecto a los resultados obtenidos en el análisis entre seris y mestizos, éste permite conocer los orígenes y diversidad en estas dos poblaciones, y las variantes prevalentes y ausentes

en cada uno de los grupos. En el caso de TAP1, el alelo TAP1D esta ausente en los seris, y como es extremadamente raro en otras poblaciones^{32,33}, podemos decir que no corresponde a una contribución seri a los mestizos, sino posiblemente a introducción del gen por parte de otro grupo indígena, o tal vez de negros, para esto es importante estudiar otras poblaciones para poder proponer un origen probable de la presencia de este alelo en mestizos. En cuanto a la distribución de frecuencias de los alelos compartidos entre seris y mestizos, es importante mencionar la diferencia en la prevalencia de variantes diferentes en unos y otros, lo que se explica porque los seris son un grupo cerrado que no admite la mezcla con otras tribus, y por lo tanto su polimorfismo genético queda limitado a la presencia de ciertos alelos, mientras que en los mestizos, se haya mayor diversidad. Se comprobó que TAP aumenta la diversidad pues el número de haplotipos presentes en los seris, es sólo de 5, al incluir los datos obtenidos de TAP se incrementaron a 17, siendo todos ellos de origen amerindio, excepto el haplotipo que acompaña al DRB1*0701 y al DRB1*11 que son de contribución mestiza³⁶. Los mestizos, como ya se mencionó tienen una diversidad mayor, pues existen 24 posibles haplotipos los cuales tienen diversos orígenes; DRB1: *0407, *0802, *1402, *0411, son de origen amerindio, mientras que DRB1*1101, 03011, son de origen caucasoide; el DRB1*0701 es mediterráneo-negroide, el *0901 proviene de negros, y el *1501 y el *0404 son de contribución mediterranea³⁶; otra vez se observa que al incorporar al haplotipo el polimorfismo de TAP, el número de combinaciones resultantes se incrementa. Por otro lado, los haplotipos compartidos entre seris y mestizos, son de contribución mestiza, indicando que si hay cierto grado de mezcla de los indígenas con poblaciones aledañas, sin embargo su frecuencia es mucho mayor, en los mestizos, como era de esperarse, pues el grado de mezcla es indudablemente mayor en ellos. El análisis por aminoácidos en los seris mostró una disminución de Thr/665/TAP2, misma que se discutirá más adelante en cuanto a su posible implicación en diabetes tipo I.

Dado el papel tan importante que juega el MHC como inductor y regulador de la respuesta inmunológica, es necesario estudiar los posibles mecanismos en los que su polimorfismo se puede relacionar con el desarrollo de una determinada patología. El polimorfismo de algunos loci del MHC se ha explorado exhaustivamente en un gran número de distintas enfermedades, sin embargo las más estudiadas y donde se ha encontrado un mayor número de asociaciones son en aquellas de origen autoinmune, que han sido muy interesantes, ya que se dan por una alteración de la respuesta inmunológica que ahora se dirige hacia el propio

individuo, hay presentación de péptidos propios que son reconocidos en el contexto de las moléculas HLA por el receptor del linfocito T. Debido a esto, hay muchos factores que pueden estar involucrados, y aquí nos interesa la participación que pueda tener TAP, ya que debido a su función en la selección de péptidos que serán transportados al interior del retículo endoplásmico para su asociación con las moléculas MHC, el presentar determinado alelo en TAP o determinadas características en la molécula podría favorecer la selección de péptidos con características potenciales para generar una respuesta autoinmune. Se han descrito asociaciones de TAP en algunas enfermedades como esclerosis múltiple, enfermedad celíaca, artritis reumatoide, lupus, diabetes tipo I, miastenia gravis, etc. en las cuales previamente se han confirmado asociaciones con otros alelos de clase II, que sugieren que dichos alelos de susceptibilidad de cada molécula pueden actuar simultáneamente potencializando el desarrollo de la enfermedad.

Este es el primer estudio realizado en México de la participación de TAP en susceptibilidad a algunas enfermedades, y que se estudia la implicación de TAP en cardiopatía reumática y síndrome de VKH, sin embargo ya se ha confirmado asociación de estas con clase II en mexicanos, pues en el caso de cardiopatía reumática se encontró una asociación con el DRB1*0403⁶³, y el DR1 y DR4 están asociados con VKH ⁷⁵.

No se observaron diferencias significativas en la distribución de las frecuencias génicas de TAP en artritis ni VKH, hay una disminución significativa del alelo TAP1B ($p=0.03$) en la cardiopatía reumática, sin embargo al corregir el valor de p multiplicando por cuatro que corresponde al número de alelos, la diferencia ya no es significativa ($pc=0.12$). Es importante mencionar que es la primera información que se obtiene en CR y será de gran importancia explorar TAPs en otras poblaciones y con mayor número de casos, pues al haber indicios de asociación hay que considerar que esta enfermedad es la consecuencia de una infección persistente y mal manejada de *Streptococcus pyogenes* grupo A y que hay evidencias claras de reactividad cruzada entre componentes del músculo cardíaco y la bacteria. Es entonces probable que algún polimorfismo de TAP particular tenga especial preferencia para transportar péptidos que puedan ser reconocidos preferencialmente por los TCR de las células Th1, facilitando el proceso autoinmune.

En el caso de la Diabetes Mellitus Dependiente de Insulina, el alelo TAP1D se encuentra disminuido significativamente en los pacientes ($pc=0.01$), por lo que podría proponerse como un

alelo de protección, sin embargo no sería un factor determinante ni muy importante, ya que su frecuencia en la población sana es muy baja, por lo que no podemos darle una importante implicación en la protección, ya que existe un gran número de individuos sanos que no presentan este alelo, es interesante mencionar que este es un alelo que solo ha sido observado en pocas poblaciones y en muy baja frecuencia; en cuanto a TAP2, se observan diferencias en la distribución de los alelos TAP2A, 2B y 2H, sin embargo, dejan de ser significativas al corregir el valor de p.

En el análisis por aminoácidos no existe ninguna diferencia en la distribución de frecuencias de cada aminoácido entre sanos y artritis, y tampoco con VKH, hay una disminución de individuos homocigotos para glicina en la posición 637 de TAP1 ($p=0.02$) en CR, la cual desaparece al corregir el valor de p. En DMDI se observó un incremento de homocigotos para la treonina en la posición 665 de TAP2 ($p=0.005$) y esto mismo ha sido descrito en noruegos, finlandeses, caucásicos, españoles y japoneses, como se mencionó en la introducción. Para saber si esta asociación es independiente al DRB1*0405 el alelo diabetogénico de clase II en mexicanos, y al DQB1*0302 el alelo de susceptibilidad en caucásicos, se efectuó un análisis de estratificación, en él se excluyó a los pacientes y a los sanos que presenten el DRB1*0405 y el incremento de Thr permaneció significativo en DMDI ($p=0.015$). Este mismo estudio se llevó a cabo con el DQB1*0302, sólo que ya no hubo diferencias entre ambos grupos. De este análisis se puede sugerir que la asociación observada con la treonina en la DMDI, es independiente a la presencia de DRB1*0405 puesto que la significancia permanece después de excluir al DRB1*0405. Esto es interesante, ya que las asociaciones que se han observado entre la Thr/665 y DMDI corresponden a un efecto debido al desequilibrio de enlace existente entre la Thr/665 y el alelo de susceptibilidad, por esta razón se efectuó también el cálculo de desequilibrio de enlace entre el DRB1*0405 y la Thr/665 y se demostró que no hay desequilibrio de enlace entre estos dos alelos, ya que el valor obtenido al aplicar la fórmula, es muy pequeño, y se acerca a cero. Además el valor de la p no fue significativo, por lo que no parece deberse la asociación del aminoácido al desequilibrio de enlace entre estos dos loci. En cuanto al DQB1*0302, TAP está más ligado a este locus, puesto que al eliminar a los individuos DQB1*0302 del estudio, desaparecen las diferencias de TAP entre ambos grupos, por lo que TAP se halla muy ligado con el DQ, que no es nada extraño, si se considera que estos loci se encuentran muy cerca uno del otro y que es muy probable que se segreguen juntos. No obstante debido a que el valor de

desequilibrio de enlace entre los dos alelos es considerablemente bajo, y más aún negativo, significa probablemente que el DQB1*0302 se segrega independientemente pues la p no es significativa. Este dato es contradictorio con los resultados que se esperarían después de efectuar el análisis de estratificación del DQB1*0302, en el que el incremento de treonina desapareció con la eliminación del DQB1*0302. En cambio en mexicanos es más fuerte la contribución del DRB1*0405 en la diabetes, que la del DQB1*0302, debido a que todos los haplotipos DR4 están ligados al DQB1*0302, sin importar el subtipo del DR4, pero en sanos la frecuencia del DRB1*0405 es apenas 3.5%³⁶. Se sugiere entonces que la segregación de Thr/665 y DRB1*0405 es completamente independiente, por lo que la contribución de TAP y DRB1 al desarrollo de la enfermedad es independiente, y TAP confiere una susceptibilidad adicional. En el Cuadro 23 se analizan las frecuencias haplotípicas de Thr/665-DRB1*0405 y en DMDI y sanos, hay un incremento de ambos haplotipos en DMDI sin embargo, el único significativo es el correspondiente a Thr/665-DQB1*0302, probablemente porque el locus DQ está más cerca de TAP que DR. Se ha demostrado previamente que varios loci de la región HLA se encuentran en desequilibrio de enlace, y que aunque los marcadores DQ y DP están localizados flanqueando a los genes TAP y exhiben un marcado desequilibrio entre ellos, este es despreciable con los genes TAP, para explicar esta observación, se ha propuesto un sitio de recombinación entre TAP1 y TAP2. Otros estudios han sugerido que TAP1 tampoco se encuentra en desequilibrio de enlace con TAP2 ni con el DRB1 y DQB1⁹⁸. Sin embargo existe un fuerte desequilibrio de enlace entre las posiciones dimórficas para un mismo locus de TAP, por ejemplo en TAP1 la val en posición 333 muestra un marcado desequilibrio de enlace con la gly de la posición 637 de este mismo locus⁹⁹. Los productos de TAP involucrados en procesamiento antigénico de clase I, podrían participar en el desarrollo de una enfermedad inmune en la cual se encuentra implicada principalmente la presentación mediada por clase II⁹⁹.

Retomando el análisis por aminoácidos de los seris, la disminución de Thr/665 en ellos es muy interesante (29 vs 42%) Aquí se postula una asociación de Thr/665 con la expresión de DMDI, en donde probablemente la Thr en la posición 665 de TAP2 podría favorecer cierta conformación en la proteína que altere su especificidad y favorezca la selección de algún péptido diabetogénico que intervenga en el desarrollo de la enfermedad. Lo interesante es que los seris al no presentar DMDI apoyan la propuesta de la participación de la thr/665 con la enfermedad. En base a estos resultados sería interesante efectuar ensayos de transporte de péptidos, y ver que

características presentan los péptidos que son transportados por las moléculas TAP que contengan Thr/66S, para tratar de dislumbrar como se da la inducción de la autoinmunidad que lleva a la destrucción de las células beta de los islotes del páncreas en base a las características del péptido y su complementaridad con las secuencias de las moléculas transportadoras.

Este trabajo es de gran importancia, pues permitió conocer el perfil genético de los genes TAP en la población general mexicana que servirán como sistema de comparación para trabajos posteriores de este sistema tan importante en fisiología y probablemente en patología.

Como se mencionó previamente, es bien sabido que la expresión de TAP en distintos tipos de cáncer está disminuida, como también la expresión de moléculas de clase I, proceso mediante el cual las células malignas evaden a la respuesta inmunológica, ya que los linfocitos T citotóxicos son incapaces de destruir a la célula tumoral pues no ve en ningún momento péptidos derivados del tumor asociados a moléculas clase I para poder activarse. En estudios realizados con tratamiento con interferón y se ha observado que se recupera la expresión tanto de TAP como de clase I y por lo tanto el reconocimiento por parte del linfocito T, esto se realizó en líneas celulares, pero en algunas líneas no era suficiente el tratamiento con interferón, las cuales se analizaron y se detectaron múltiples mutaciones en los genes TAP que impedían su expresión, probablemente debidas a que durante la transformación maligna ocurren diversas mutaciones que dañan diversos genes incluso a TAP, y esta expresión se recuperó, al introducir los genes normales para TAP, lo que es muy alentador y estimulante para efectuar ensayos utilizando un modelo animal, en el que podamos verificar si efectivamente hay una participación importante de TAP en favorecer la respuesta inmunológica en contra del desarrollo tumoral. Sería un trabajo interesante del cual podrían sacarse conclusiones que tal vez permitirían proponer a los genes TAP como un modelo de terapia génica en algunos tipos de cáncer o en las enfermedades autoinmunes en las que TAP contribuye en la protección.

El procesamiento antigénico es un amplio campo de estudio que debería explorarse mucho más para conocer los mecanismos inmunológicos que contribuyen al desencadenamiento de la autoinmunidad.

X. CONCLUSIONES

1. Es el primer trabajo realizado que demuestra la distribución de las frecuencias génicas de TAP1 y TAP2 en México, se incluyeron 2 poblaciones: mestizos y el grupo indígena de los seris.
2. Los alelos más prevalentes en población mestiza son: TAP1A 88.52 %, TAP2A 78.00%, TAP2B 53.42%, los alelos TAP1C, 2F y 2G están ausentes en este grupo.
3. Los alelos más frecuentes en seris son: TAP1A 96%, TAP1B 50%, TAP2A 67%, TAP2B 70%, ausentes los alelos TAP 1C, 1D y TAP 2E, 2F, y 2H
5. Al incluir los alelos de TAP dentro de los haplotipos de clase II, se incrementa la diversidad, de 17 a 24 posibles haplotipos en el caso de los mestizos, y de 5 a 17 en el caso de los seris.
6. Es el primer estudio de la implicación de TAP en cardiopatía reumática y en síndrome de VKH.
7. No se observó ninguna diferencia significativa en la distribución de las frecuencias génicas de TAP en artritis, fiebre reumática, ni síndrome de VKH con respecto a los controles.
8. En el caso de la DMDI se encuentra ausente el alelo TAP 1D dando una diferencia significativa ($p=0.003$) con respecto a los controles, lo que le confiere un ligero efecto protector.
9. El análisis por aminoácidos no revela ninguna diferencia significativa entre los controles y artritis, fiebre reumática ni síndrome de VKH.
10. Hay un incremento de individuos homocigotos para Thr en la posición 665 de TAP 2 en los individuos con DMDI.
11. El análisis del desequilibrio de enlace con los alelos diabetogénicos DRB1*0405, DQB1*0302, indica que la segregación de la treonina en la posición 665 de TAP2 es independiente a la segregación de los alelos diabetogénicos, constituyendo un alelo adicional e independiente de susceptibilidad a la diabetes tipo I.
12. La disminución de Thr/665 y la ausencia de diabetes tipo I en los seris, apoyan la propuesta de considerar a TAP como un factor más involucrado en la susceptibilidad.

13. Es necesario utilizar alguna otra técnica alterna que nos permita la asignación de alelos en individuos heterocigotos a más de una posición polimórfica.

XI. APÉNDICE

Material:

Guantes
Propipetas
Micropipetas
Puntas para micropipetas
Gradillas para tubos de 15 y 50 mL
Ligadura y jeringas de 20 mL
Torundas
Pipetas graduadas de 1-10 mL
Puntas para micropipetas de 1000 μ L
Tubos para microcentrífuga de 1.5 mL
Tubos para centrifuga de 50 mL
Probetas de diferentes volúmenes
Flotadores
Rollos de película instantánea Polaroid

Equipo:

Microcentrífuga
Congelador -20°C
Refrigerador
Termociclador
Cámara de Electroforesis
Fuente de poder
Transiluminador
Cámara Polaroid para transiluminador
Centrífuga refrigerada
Baño maría a 53°C

Preparación de reactivos

Nota: Tanto las soluciones como el material utilizados deberán esterilizarse antes de su manejo y deberán tomarse las precauciones necesarias para trabajar en condiciones muy limpias. Todas las soluciones deberán filtrarse y esterilizarse en autoclave o con membrana Millipore 0.22 μm .

-Solución I-

Preparar aproximadamente 100 mL por cada muestra de sangre si la lisis se hace en tubos de 50 mL.

MgCl₂ 5mM

A partir de una solución madre de MgCl₂ 1M (conservada a temperatura ambiente).

-Solución II-

Preparar aproximadamente 50 mL por cada muestra de sangre. Agregar:

MgCl ₂	5 mM
NONIDET (NP-40)	0.1% (preparado a partir de una solución madre de NP-40 al 10% que se conserva a temperatura ambiente).

Nota: Ambas soluciones se preparan con H₂O bidestilada estéril fría (aproximadamente a 4°C) en el momento de la lisis. Se conservan a 4°C mientras se trabaja.

-Amortiguador para lisis de células blancas (WCLB-White Cell Lysis Buffer)-

Tris-HCl, pH 7.6	10 mM
EDTA, pH 8.0	10 mM
NaCl	50 mM
SDS	0.2 %
Proteinasa K (sigma)	300 $\mu\text{g/mL}$

(Esterilizar por filtración).

Guardar la solución en alícuotas de 15 mL a - 20°C

-Solución Salina con Citrato SSC 20X-

NaCl	3.0 M
Citrato de sodio	0.3 M
Agua cbp	1 L

-Fenol saturado equilibrado-

Antes de usar el fenol debe equilibrarse a pH mayor de 7.8, porque el DNA puede quedarse dentro de la fase orgánica (fenólica) si el pH es ácido.

1. El fenol bidestilado debe almacenarse a -20°C . Cuando se prepara el fenol equilibrado se funde a 68°C (baño maría). Al fenol líquido se le adiciona 8-hidroxiquinolina a una concentración final de 0.1%. La 8-hidroxiquinolina es un antioxidante, un inhibidor parcial de RNAsa y un quelante débil de iones.
2. Añadir un volumen igual de Tris-HCl 0.5 M, pH 8.0 a temperatura ambiente. Agitar con una barra magnética durante 15 min, permitir que se separen las dos fases, eliminar la fase superior (acuosa)
3. Adicionar a la fase inferior (fenólica) un volumen igual de Tris-HCl 0.1 M, pH 8.0. Agitar de igual forma que en el punto 2, remover la fase acuosa.
4. Repetir el paso 3, hasta que la fase fenólica alcance un pH mayor de 7.8 (aproximadamente pH 8.0).
5. Después de que el fenol está equilibrado, remover la fase acuosa y adicionar 0.1 volumen de Tris-HCl 0.1 M, pH 8.0 conteniendo 0.2 % de 2-mercaptoetanol.
6. Guardar en un frasco ámbar a 4°C por períodos mayores de 1 mes.

-Cloroformo/Alcohol isoamílico-

Tomar 24 partes de cloroformo puro y añadir una parte de alcohol isoamílico, mezclar y guardar a 4°C .

-Fenol/cloroformo-

Para preparar el fenol/cloroformo debe eliminarse la fase superior del fenol saturado o tomar sólo la fase fenólica y mezclar cantidades iguales de fenol saturado y cloroformo/ alcohol isoamílico. Mezclar, dejar a 4°C toda la noche. Utilizar la fase inferior.

-NaCl 3M-

-Isopropanol Absoluto-

-Etanol al 70%-

-Solución de Tris-EDTA (TE IX)-

Tris-HCl, pH 8.0	10 mM
EDTA, pH 8.0	1 mM

XII. BIBLIOGRAFÍA

- ¹ Mizuky N, Inoko H, Ohno S. Role of HLA and T lymphocytes in the immune response. *Ocular Immunol. Inflammat.* 2:57-91, 1994.
- ² So A. Genetics, Polymorphism and regulation of expression of HLA region genes. En: Lechler, R. HLA and Disease. Academic Press. Nueva York, pp1-34, 1994.
- ³ Brodsky F, Lem L, Bresnahan P. Antigen processing and presentation. *Tissue Antigens* 47:464-471, 1996.
- ⁴ Bodmer J G., Marsh S G E, Ekkehard D A, Bodmer W F., Bontrop R E, Charron D, Erlich B D H, Fauchet R, Mach B, Mayt W R, Parham P, Sasazuki T, Schreuder G M T, Strominger J L, Svejgaard A, Terasaki P I; Nomenclature for factors of the HLA system, *Tissue Antigens.* 49:297-321, 1997.
- ⁵ Campbell RD, Trowsdale J. Map of the human MHC. *Immunol. Today* 14:349-352, 1997.
- ⁶ Cresswell P.. Assembly, transport, and function of MHC class II molecules. *Annu. Rev. Immunol.* 12:259-294, 1994
- ⁷ Brown JH, Jardetzky TS, Gorga JC, Stern LJ, Urban RG, Strominger JL, Wiley DC. Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature* 364:33-39, 1993.
- ⁸ Fainboim L, Satz L. Presentacion Antigénica y activación linfocitaria. Capitulo 10. Introducción a la Inmunología Humana.. 3a. Edición. Buenos Aires, marzo, 1995.
- ⁹ Madden DR. The three dimensional structure of peptide-MHC complexes. *Ann. Rev. Immunol.* 12:181-208, 1995.
- ¹⁰ Raposo G, Nijman H, Stoorvogel W, Leijendekker R, Harding C, Melief C, Geuze H. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J. Exp. Med.* 183:1161-1172, 1996.
- ¹¹ Trowsdale. The 12th International MHC map. En HLA. Charron D. Ed. EDK. Paris Francia. I:499-504, 1997
- ¹² Pfeiffer C, Stein J. Altered peptide ligands can control CD4 t lymphocyte differentiation in vivo. *J Exp Med,* 181:1569-74, 1995.

-
- ¹³ Pinet V, Vergelli M. Antigen presentation mediated by recycling of surface HLA-DR molecules. *Nature*, 375:603-6, 1995
- ¹⁴ Swier K, Miller J: Efficient internalization of MHC class II-invariant chain complexes is not sufficient for invariant chain proteolysis and class II antigen presentation. *J Immunol*,155:630-43, 1995
- ¹⁵ Rock KL.. A new foreign policy: MHC class I molecules monitor the outside world. *Immunol. Today* 17:131-137, 1996.
- ¹⁶ Carmichael P, Kerr LA. The TAP complex influences allorecognition of class II MHC molecules. *Human Immunology* 50,70-77, 1996.
- ¹⁷ Kenneth L. Rock. A new foreign policy: MHC class I molecules monitor the outside world. *Immunol today*. Vol.17, No.3, 131-137, March 1996.
- ¹⁸ Trowsdale J, Hanson I, Mockridge I, Beck S, Townsend A, Kelly A. Sequences encoded in the class II region of the MHC related to the "ABC" superfamily of transporters. *Nature*. 348:20-27, 1990.
- ¹⁹ Hidde L. Ploegh. Viral Strategies of Immune Evasion. *Science*, 280:248-253, 1998.
- ²⁰ Yang Y, Sempé P, Peterson PA. Molecular Mechanisms of Class I Major Histocompatibility Complex Antigen Processing and Presentation. *Immunol. Res.*;15:208-233, 1996.
- ²¹ Ellis J. Proteins as molecular chaperones. *Nature* 328:378-379. 1987.
- ²² Helenius A, Marquardt T, Braakman I. The endoplasmic reticulum as a protein-folding compartment. *Trends Cell Biol* 2:227-231, 1992.
- ²³ Sadasivan B; Lehner, PJ. *Immunity* 5:103-114, 1996.
- ²⁴ Elliott T. How does TAP associate with MHC class I molecules?. *Immunology Today*. Vol.18, No.8, 375-379. August 1997.
- ²⁵ Brodsky F.M., Lem L.. Antigen processing and presentation. *Tissue Antigens*.,47:464-471, 1996.
- ²⁶ Kuist S, Lévy F. Early events in the assembly of MHC class I antigens. *Seminars in Immunology*, Vol 5,:105-116, 1993.
- ²⁷ Salcedo M, Momburg F. Resistance to Natural Killer Cell Lysis Conferred by TAP1/2 Genes in Human Antigen Processing Mutant Cells.
- ²⁸ Hill A, Jugovic P, York I, Russ G, Bennink J, Yewdell J, Ploegh H, Johnson D. Herpes simplex virus turns off the TAP to evade host immunity. *Letters to Nature*. *Nature*. Vol 375. June

1995.

- ²⁹ Neumann L, Kraas W. The Active Domain of the Herpes Simplex Virus Protein ICP47: A potent inhibitor of the transporter Associated with Antigen Processing (TAP). *JMB*:484-492, 1997.
- ³⁰ Seliger B, Markus J. TAP off-tumors on. *Immunology today*. Vol.18, No.6:292, June 1997.
- ³¹ (7S) Tighe R, Hall M. Associations Between Alleles of the Major Histocompatibility Complex-Encoded ABC Transporter Gene TAP2, HLA Class II Alleles, and Celiac Disease Susceptibility. *Human Immunology* 39, 9-16, 1994.
- ³² Wordsworth BP, Pile KD, Gibson K, Burney RO, Mockridge I, Powis SH. Analysis of the MHC-encoded transporters TAP1 and TAP2 in rheumatoid arthritis: linkage with DR4 accounts for the association with a minor TAP2 allele. *Tissue Antigens* 42: 153-155, 1993.
- ³³ Chevrier D. Effects of MHC-encoded TAP1 and TAP2 gene Polymorphism and matching on kidney graft rejection. *Transplantation*. Vol.60, 292-296, No.3, August 15, 1995.
- ³⁴ Powis SJ, Deverson EV. Effect of polymorphism of an MHC-linked transporter on the peptides assembled in a class I molecule. *Nature* 357:211-215, 1992.
- ³⁵ Bignon JD; Fernandez-Viña M. Technical Handbook, Twelfth International Histocompatibility Workshop. Publisher: HLA et Medecine, Paris-France. 1996.
- ³⁶ Charron D. Genetic diversity of HLA functional and medical implication. Pp 160. 1997, EDK, Paris, France.
- ³⁷ (51E) Williams R., Knowler W., Butler W. HLA-A2 and Type 2 (Insulin Independent) diabetes mellitus in Pima Indians: an association of allele frequency with age. *Diabetologia*, 21:460-463, 1981.
- ³⁸ (16E) Rifkin H., Porte D. *Diabetes Mellitus. Theory and Practice*, USA:358-359, 1990.
- ³⁹ (2E). Jean W, Daniel F. Ed. *Williams Textbook of Endocrinology*, W.B. Saunders Company, USA:1262-1265, 1992.
- ⁴⁰ (3E). Kahn C., Weir G. Ed. *Joslin's Diabetes Mellitus*, Lea/Febiger, USA:216-239, 1994.
- ⁴¹ (4E) Rifkin H., Porte D. *Diabetes Mellitus. Theory and Practice*, USA:341-345, 1990.
- ⁴² (29E). Elbein S., Chiu K., Hoffman M., Mayorga R., Bragg K., Leppert, M. Linkage analysis of 19 candidate regions for insulin resistance in familial NIDDM. *Diabetes*,44:1259-1265, 1995.
- ⁴³ (54E) Iyengar S., Hamman R., Marshall J., Baxter J., Majumder P., and Ferrell R. Genetic studies of type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: lack of association with seven genetic

markers. *Diabetologia*, 32:690-693, 1989.

⁴⁴ (55E) Groop L., Miettinen A., Groop P., Meri S., Koskimies S., and Bottazzo F. Organ-specific autoimmunity and HLA-DR antigens as markers for B-cell destruction in patients with type II diabetes. *Diabetes*, 37:99-103, 1988.

⁴⁵ Gorodezky C, Olivo A, Debaz H. Inmunogenetica de la "Diabetes mellitus" tipo I en poblaciones mestizas de Mexico, Colombia y Venezuela, In: Martin Municio A, Garcia Barreno P. Polimorfismo genico (HLA) en poblaciones hispanoamericanas. Madrid, Real Academia de Ciencias Exactas, Fisicas y Naturales:215-230, 1996.

⁴⁶(61E) Rich S., French R., Sprafka J., Clements J., Goetz E. HLA-associated susceptibility to type 2 (non-insulin dependent) diabetes mellitus: the Wadena City Health Study. *Diabetologia* 35:234-238, 1993.

⁴⁷ Wang F, Xiangping L, Annis B, Faustman D. Tap-1 and Tap-2 Gene Therapy Selectively Restores Conformationally Dependent HLA Class I Expression in Type I Diabetic Cells. *Human Gene Therapy*. 6:1005-1017, August 1995.

⁴⁸ (S41) Ronningen K, Undlien D, Ploski R, Maouni N, Konrad R, Jensen E, Hornes E, Reijonen E, Colonna M, Monos D, Strominger J, Thorsby E. Linkage disequilibrium between TAP2 variants and HLA class II alleles: no primary association between TAP2 variants and insulin-dependent diabetes mellitus. *J. Immunol.* 23:1050-1056, 1993.

⁴⁹ (S86) Liandong M, Penforinis A, Xaiolin W, Schoenfeld D, DiMe T, Tuomilehta-Wolf E, Metcalfe K, Hitman G, Faustman D. Evaluation of TAP1 Polymorphisms with Insulin Dependent Diabetes Mellitus in Finnish Diabetic Patients. *Human Immunology* 53, 159-166, 1997.

⁵⁰ (S44) Caillat-Zucman S, Bertin E, Timsit J, Boitard C, Assan R, Bach J. Protection from insulin-dependent diabetes mellitus is linked to a peptide transporter gene. *Eur. J. Immunol.* 23:1784-1788, 1993.

⁵¹ (S78) Maungendre D., Alizadeh M., Gauthier A., Guilhem I., Pouillaud C., Genetet B., Allannie H., Semana G. Genetic heterogeneity between type 1a and type 1b insulin-dependent diabetes mellitus: HLA Class II and TAP gene analysis. *Tissue Antigens*. 48: 540-548, 1996.

⁵² (S14) Caillat-Zuckman S, Daniel S, Djilali-Saiah I, Timsit J, Garchon H, Boitard C, Bach J. Family Study of Linkage Disequilibrium Between TAP2 Transporter and HLA Class II Genes. Absence of TAP2 Contribution to Association with Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *Human Immunology* 44, 80-87, ASHI 1995.

- ⁵³ (S3) Cucca F., Congia M., Trowsdale J., Powis S. H. Insulin-dependent diabetes mellitus and the major histocompatibility complex peptide transporters TAP1 and TAP2: no association in a population with a high disease incidence. *Tissue Antigens*. 44: 234-240, 1994
- ⁵⁴ (S63) Esposito L., Lampasona V., Bosi E., Poli F., Ferrari M., Bonifacio E.. HLA DQA1-DQB1-TAP2 haplotypes in IDDM families: no evidence for an additional contribution to disease risk by the TAP2 locus. *Diabetologia*. 38:968-974, 1995.
- ⁵⁵ (S98) Martinez-Laso J, Martín-Villa JM, Alvarez M, Martinez N, Lledo G, Arnaiz A. Susceptibility to insulin-dependent diabetes mellitus and short cytoplasmic ATP-binding domain TAP2*01 alleles. *Tissue Antigens*, 44:184-188,1994.
- ⁵⁶ (S64). Van Endert P, Liblau R, Patel S, Fugger L, Lopez T, Pociot F, Nerup J, Medevitt H. Major Histocompatibility Complex-Encoded Antigen Processing Gene Polymorphism in IDDM. *Diabetes*. 43, 1994
- ⁵⁷ (S57) Nakanishi K, Kobayashi T, Murase T, Kosaka K. Lack of Association of the Transporter Associated With Antigen Processing with Japanese Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *Metabolism*, 43-8:1013-1017, 1994.
- ⁵⁸ (S49) Kawaguchi Y, Ikegami H, Fukuda M, Takekawa M, Fujioka Y, Fujisawa T, Ueda H, Ogihara T. Absence of Association of TAP and LMP genes with type I Diabetes Mellitus. *Life Sciences*, 54-26:2049-2053, 1994.
- ⁵⁹ Stites D., *Rheumatic Diseases*, en: *Basic & clinical Immunology*, 5th edition, Lange Medical Publications, Chapter 23, pp428-559, California 1984.
- ⁶⁰ Nepom GT, Seyfried CE, Hobeck SL, Wilske KR, Nepom BS: Identification of HLADw-14 genes in DR4+ thymosyof arthritis. *Lancet* 2:1002,1986.
- ⁶¹ Maeda H, Juji T, Mitsui H, Sonozaki H, Okitsu K: HLA DR4 and rheumatoid arthritis in Japanese. *Arthritis Reum* 24:722,1981.
- ⁶² Gao X, Brautbar C, Gazit E, Stasny P: A variant of HLA-DR4 determines susceptibility to rheumatoid arthritis in a subset of Israeli Jews. *Arthritis Rheum* 34:547,1991.
- ⁶³ Debaz H, Olivo A, Vazquez M, Gorodezky C. Relevant Residues of DRβ1 Third Hypervariable Region Contributin to the Expression and to Severity of Rheumatoid Arthritis (RA) in Mexicans. *Human immunol*. 59:287-294 1998.
- ⁶⁴ Wordsworth BP, Pile KD, Gibson K., Burney RO, Mockiridge I Powis SH. Analysis of the MHC-encoded transporters TAP1 and TAP2 in rheumatoid arthritis: linkage with DR4 accounts

for the association with a minor TAP2 allele. *Tissue Antigens*, 42:153-155, 1993.

⁶⁵ Ploski R, Undlien D, Vinje O, Forre O, Thorsby E, Ronningen K. Polymorphism of Human Major Histocompatibility Complex-Encoded Transporter Associated with Antigen Processing (TAP) Genes and Susceptibility to Juvenile Rheumatoid Arthritis. *Human Immunol.* 39:54-60, 1994.

⁶⁶ Westman P, Partanen J, Leirisalo-Repo M, Koskimies S. TAP1 and TAP2 Polymorphism in HLA-B27-Positive Subpopulations: No Allelic Differences in Ankylosing Spondylitis and Reactive Arthritis. *Human Immunology.* 44:236-242,1995.

⁶⁷ Na R, Forster D, Spalton DJ: Vogt Koyanagi Harada Syndrome. The Uvea. Uveitis and Intraocular Neoplasma. *Textbook of Ophthalmology.* De. Podos-Yanoff. Gower Medical Publishing. Pp 8.13-8-17. 1992

⁶⁸ Perry HD, Font RL: Clinical and histopathological observations in severe Vogt Koyanagi Harada Syndrome. *Am J Ophthalmol* 82:242-254,1977.

⁶⁹ Nussenblatt RB, Palestine AG. The Vogt Koyanagi Harada Syndrome. Uveitis. *Fundamentals and Clinical Practice.* Year Book Medical Publishers, pp 274-290, 1989.

⁷⁰ Snyder DA, Tessler HH: Vogt Koyanagi Harada Syndrome. *Am J Ophthalmol*, 90:69-75,1980.

⁷¹ Arellanes L. Síndrome de Vogt Koyanagi Harada, Cuadernos de Educación Oftalmológica, Vol.5 No. 2. Alcon. México.

⁷² Friedlander MH: Vogt Koyanagi Harada Syndrome. En: *Allergy and Immunology of the Eye.* Raven Press, 2nd, pp 272-275, 1993.

⁷³ Ohno S: Immunological aspects of Behcet's and Vogt Koyanagi Harada disease. *Trans Ophthalmol Soc UK* 101:335-341,1981.

⁷⁴ Davis JL: HLA Associations and ancestry in Vogt Koyanagi Harada disease and Sympathetic Ophthalmia. *Ophthalmol* 97:1137-1142,1990.

⁷⁵ Arellanes-García L, Bautista N, Mora P, Ortega- Larrocea G, Burguete A, Gorodezky C. HLA-DR is strongly associated to Vogt Koyanagi Harada disease in Mexican Meztizo patients. *Ocular Immunol and Inflammation*; 6:63-100, 1988.

⁷⁶ Westman P, Partanen J, Leirisalo-Repo M, Koskimies S. TAP1 and TAP2 Polymorphism in HLA-B27 positive subpopulations: No Allelic Differences in Ankylosing Spondylitis and Reactive Arthritis. *Human Immunol* 44:236-242, 1995.

⁷⁷ Barron K, Reveille J, Carrington M, Mann D, Robinson M. Susceptibility to Reiter's Syndrome

is associated with alleles of TAP genes. *Arthritis & Rheumatism* 38-5:684-689, 1995. :

⁷⁸ Meddeb-Garnaoui A., Zeliszewski D., Mougenot J. F., Djilali-Saiah I., Caillat-Zucman S., Dormoy A., Gaudebout C., Tongio M. M., Baudon J. J., Sterkers G. Reevaluation of the relative risk for susceptibility to Celiac Disease of HLA-DRB1,-DQA1,-DQB1,-DPB1, and -TAP2 alleles in a french population. *Human Immunol.* 43:190-199, 1995.

⁷⁹ Powis S, Rosenberg W, Hall M, Mockridge I, Tonks S, Ivinson A, Ciclitira P, Jewell D, Lanchbury J, Bell J, Trowsdale J. TAP1 and TAP2 polymorphism in coeliac disease. *Immunogenetics* 38:345-350, 1993.

⁸⁰ Vandevyver C, Stinissen P, Cassiman J, Raus J. TAP1 and TAP2 transporter gene polymorphisms in multiple sclerosis: No evidence for disease association with TAP. *Journal of Neuroimmunol.* 54:35-40, 1994.

⁸¹ Bell R, Ramachandran S. The relationship of TAP1 and TAP2 dimorphisms to multiple sclerosis susceptibility. *Journal of Neuroimmunol.* 59:201-204, 1995.

⁸² Spurkland A, Knutsen I, Undlien D, Vartdal F. No association of Multiple Sclerosis to alleles at the TAP2 locus. *Human Immunol.* 39:299-301,1994.

⁸³ Moins-Teisserenc H, Semana G, Alizadeh M, Loiseau P, Bobrymina V, Deschamps I, Edan G, Brigitte Birebent, Bernard Genetet, Olivier Sabouraud, and Dominique Charron. TAP2 gene polymorphism contributes to genetic susceptibility to Multiple Sclerosis. *Human Immunol.* 42:195-202,1995.

⁸⁴ Middleton D, Megaw G, Cullen C, Hawkins S, Darke C, Savage D. TAP1 and TAP2 polymorphism in Multiple Sclerosis patients. *Human Immunol.* 40:131-134, 1994.

⁸⁵ Hjelmström P., Giscombe R., Lefvert A.K., Pirskanen R., Kockum I., Landin-Olsson M., Sanjeevi C.B. TAP polymorphisms in Swedish myasthenia gravis patients. *Tissue Antigens* 49:176-179, 1997.

⁸⁶ Rajalingam R, Singal DP, Mehra NK. Transporter associated with antigen-processing (TAP) genes and susceptibility to tuberculoid leprosy and pulmonary tuberculosis. *Tissue Antigens* 49:168-172, 1997.

⁸⁷ Fakler J, Schmitt-Egenolf M, Vejbaesya S, Boehncke W, Sterry W, Eiermann T. Analysis of TAP2 and HLA-DP gene polymorphism in Psoriasis. *Human Immunol.* 40:299-302, 1994.

⁸⁸ Ishihara M, Ohno S., Ishida T., Naruse T., Kagiya M., Mizuki N., Maruya E., Saji H., Inoko H. Analysis of allelic variation of the TAP2 gene in sarcoidosis. *Tissue Antigens.* 49:107-110,

1997.

⁸⁹ Savage D. A., Ng S. C., Howe H. S., Ngai J. L. F., Darke C., Hui K. M. HLA and TAP associations in chinese systemic lupus erythematosus patients. *Tissue Antigens* 46:213-216, 1995.

⁹⁰ Davies EJ, Donn RP, Hillarby MC, Grennan DM, Ollier WER. Polymorphisms of the TAP2 transporter gene in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 53:61-63, 1994.

⁹¹ Perez M. síntesis de Terrazas B, Pueblos indígenas de México: Seris, Instituto Nacional Indigenista, Secretaria de Desarrollo Social.

⁹² *Current Protocols in Molecular Biology*, Cap. 2

⁹³ Bignon JD; Fernandez-Viña M. 1996. Technical Handbook, Twelfth International Histocompatibility Workshop. Publisher: HLA et Medicine, Paris.

⁹⁴ Gorodezky C, Libro de bibliografía del XIII curso Teorico-Practico de Actualización en Genética Molecular. . Depto. Immunogenetica. INDRE. Julio 1998.

⁹⁵ Mattiuz PL, Ihde D, Piazza A, Ceppellini R, Bodmer WF; Genetic and segragation analysis of the HLA-A system. *Histocompatibility Testing 1970*, Paul I. Terasaki, Report of an International Workshop UCLA/Palm Springs, California, y The fourth international histocompatibility conference at Los Angeles, California, EUA 1970.

⁹⁶ Fraile A, Vinasco J, Nieto A, Pareja E, Martin J. Typing for TAP alleles using PCR-RFLP with amplification-created restriction sites. *Tissue Antigens*, 47:346-352, 1996.

⁹⁷ Zetterquist H, Olerup O. Identification of the HLA-DRB1*04, -DRB1*07, and -DRB1*09 Alleles by PCR Amplification with Sequence-Specific Primers (PCR-SSP) in 2 hours. *Human Immunol.* 34:64-74, 1992.

⁹⁸ Yan G, Shi L, Fu Y, Wang X, Schoenfeld D, Ma L, Penformis L, Gebel H, Faustman D. Screening of the TAP1 gene by denaturing gradient gel electrophoresis in insulin-dependent diabetes mellitus: detection and comparison of new polymorphisms between patients and controls. *Tissue Antigens* 50:576-585, 1997.

⁹⁹ Chevrier D, Giral M, Perichot R, Latinne D, Coville P, Muller J, Soullillou J, Bignon J. Idiopathic and secondary membranous nephropathy and polymorphism at TAP1 and HLA-DMA loci. *Tissue Antigens* 50:164-169, 1997.