

11262



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGIA Y
NEUROCIRUGIA

ASOCIACION ENTRE GENES DEL HLA CLASE II Y
DM TIPO 1 Y TIPO 2 EN NIÑOS MESTIZOS
MEXICANOS

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS MEDICAS

P R E S E N T A:

DRA. ANA LILIA RODRIGUEZ VENTURA

DIRECTOR DE TESIS:

DR. JULIO GRANADOS ARRIOLA.

COTUTOR:

DR. JESUS KAZUO YAMAMOTO FURUSHO



MEXICO, D. F.

2004



Universidad Nacional
Autónoma de México




UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Ministerio de Educación y Ciencia
Instituto de Investigaciones de la
Universidad de Chile
Departamento de Historia y Geografía

Ana Lilia
Rodríguez Ventura
17/06/04


ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

DEDICATORIAS

A mi padre José Rodríguez García, por su admirable capacidad de amar y su inmenso esfuerzo por brindarnos Educación, su mejor legado.

A mi madre Rosario por su increíble fortaleza, confianza y apoyo.

A mi esposo Kazuo por su contagioso entusiasmo en la lucha constante de superación y profesionalismo, así como su ejemplar entrega en todos los aspectos.

A nuestras pequeñas hijas Karen y Katia por inspirarnos tanto amor y deseos de mejorar día con día.

A mi Maestro Julio Granados Arriola por su vanguardista concepto y aplicación de la Enseñanza. Mil gracias por su invaluable apoyo.

A mis hermanos, amigos, profesores, colegas, alumnos y pacientes, de quienes siempre he aprendido algo.

INDICE

| | |
|---|----|
| 1. Dedicatorias | 2 |
| 2. Antecedentes | 5 |
| A. Epidemiología de Diabetes mellitus | 5 |
| B. Complejo Mayor de histocompatibilidad | 6 |
| C. Factores genéticos de Diabetes mellitus tipo 1 | 9 |
| D. Factores genéticos y etiológicos de Diabetes mellitus tipo 2 | 11 |
| 3. Planteamiento del problema | 13 |
| 4. Justificación | 14 |
| 5. Objetivos | 15 |
| 6. Hipótesis | 16 |
| 7. Pacientes y métodos | 17 |
| 8. Resultados | 22 |
| 9. Discusión | 29 |
| 10. Conclusiones | 32 |
| 11. Referencias bibliográficas | 33 |
| 12. Anexos | 38 |
| 1. Hoja de recolección de datos | 38 |
| 2. Carta de Consentimiento informado | 39 |
| 3. Equipo y técnicas de laboratorio | 40 |

RESUMEN

Antecedentes: La diabetes mellitus tipo 1 es la tercera enfermedad crónica de la infancia; en su etiopatogenia participan factores genéticos y ambientales, existe asociación con genes del HLA clase II DR3/DR4.

Objetivo: Determinar la asociación entre las frecuencias génicas del HLA clase II y la diabetes mellitus tipo 1 y 2 en niños mestizos mexicanos.

Pacientes y Métodos: Se estudiaron 100 niños diabéticos mestizos mexicanos, de los cuales 71 eran tipo 1 y los restantes tipo 2 así como 99 controles sanos. Se registraron los antecedentes y características clínicas de cada paciente. La tipificación del locus HLA-DR se realizó mediante técnicas de biología molecular.

Resultados: Los alelos HLA-DR4 y DR3 se encontraron aumentados significativamente en el grupo de niños con DM tipo 1 con respecto al grupo control ($pC=0.0000001$, $RM=3.59$, $IC95\%: 2.2-5.8$ y $pC=0.00009$, $RM=4.66$, $IC95\%: 2.15-10.3$ respectivamente). En los niños con DM 2 se observó disminución de la frecuencia del alelo HLA-DR4 ($pC=0.0006$, $RM=0.24$, $IC95\%: 0.11-0.53$) y aumento de la frecuencia génica del alelo HLA-DR8 ($pC=0.0001$, $RM=10.58$, $IC95\%: 3.40-8$) al compararse con los niños con DM tipo 1, sin embargo, al compararse con el grupo control no existieron diferencias estadísticamente significativas.

Conclusión: Existen diferencias genéticas entre los niños con DM 1 y DM 2. Los alelos HLA-DR 3 y DR4 se asociaron con la susceptibilidad genética para el desarrollo de DM tipo 1 en niños mestizos mexicanos. La distribución de los alelos del HLA-DR entre los niños con DM tipo 2 y los controles sanos fue similar.

ANTECEDENTES

Epidemiología.

La diabetes mellitus (DM) es un grupo heterogéneo de alteraciones en las que hay un estado de hiperglucemia con diferentes mecanismos etiopatogénicos (1), de acuerdo a los cuales se hizo una nueva clasificación de DM desde 1997: Autoinmune o tipo 1 (dependiente de insulina), Resistencia a la insulina y/o déficit parcial de insulina o tipo 2, Diabetes secundaria a un defecto bien identificado (genético –MODY-, infecciones o traumatismos pancreáticos, medicamentos, etc.) y la Diabetes gestacional (2).

La prevalencia de DM 1 es de 1 caso por 2500 niños a los 5 años de edad hasta un caso en 300 niños para los 18 años de edad. La incidencia anual en USA es de 7 casos nuevos por 100000 niños (menores de 18 años) y en Finlandia es de 30-40 casos por 100000 niños (3).

La DM tipo 2 afecta a 15.6 millones de personas en USA (4) y en los últimos años ha incrementado en niños, en algunos centros hospitalarios se menciona que de todos los casos nuevos de diabetes en niños, el 25-30% corresponde a DM tipo 2, siendo más común en afroamericanos, hispanos, hindúes, indios americanos nativos e incluso en blancos; los factores de riesgo asociados son origen étnico, obesidad y sexo femenino; los síntomas varían desde estados de hiperglucemia asintomáticos hasta la franca cetoacidosis (5).

El complejo principal de histocompatibilidad.

La regulación del sistema inmune es factible gracias a la participación de moléculas codificadas por numerosos genes, algunos de ellos localizados dentro de un sistema genético denominado complejo principal de histocompatibilidad o MHC (siglas en inglés Major Histocompatibility Complex), el cual está localizado en el brazo corto del cromosoma 6 y ocupa una región de 4,000 Kb (6).

El producto de los genes del MHC tiene como función participar en el reconocimiento antigénico por parte de los linfocitos T; este proceso es en cierta manera complejo y se lleva a cabo por medio del reconocimiento de determinantes antigénicos en asociación con un antígeno propio, el cual es expresado por los genes del MHC. Existen tres clases de genes del MHC: los clase I, clase II y clase III, los dos primeros codifican para antígenos leucocitarios humanos (HLA, siglas en inglés) y el último codifica para componentes del complemento (7). Estas moléculas funcionan como elementos de restricción, esenciales para el reconocimiento de antígenos (tumoraes o virales) por linfocitos T citotóxicos (clase I) que expresan el marcador CD8 (8) y por los linfocitos T cooperadores (clase II).

Los genes clase II se localizan en el extremo centromérico del brazo corto del cromosoma 6, dicha región incluye a los loci HLA-DR, DP y DQ, cada uno de ellos está constituido por las cadenas A y B que codifican para una cadena alfa de 33 Kd y otra beta de 28 Kd que dan lugar a la expresión de una glucoproteína dimérica llamada antígeno clase II. Estos antígenos se expresan sólo en los macrófagos, linfocitos T activados, T cooperadores, linfocitos B, células dendríticas, epiteliales y endoteliales.

Las moléculas clase II presentan 2 cadenas alfa y 2 beta. La cadena beta es la más polimórfica, especialmente la beta 1, aunque en los DQ y los DP la cadena alfa si es polimórfica. Ambas cadenas se hallan insertadas en la membrana celular mediante un dominio transmembranal y tienen también una región intracitoplásmica. Los loci HLA-DRA1 y DRB1 codifican para los polipéptidos alfa y beta respectivamente los cuales forman una molécula madura de HLA-DR clase II. Los productos de los loci DQA1 y DQB1 forman la molécula DQ y los loci DPA1 y DPB1 codifican para la molécula DP.

Los genes clase III se encuentran ubicados en una porción de 12 Kb entre los genes clase I y II dentro del MHC que se hereda como unidad genética conocida como "complotipo o haplotipo del complemento". Cada complotipo codifica la síntesis de los factores del complemento C2, C4A y C4B de la vía clásica y el factor B de la vía alterna; intercalados entre los genes C4A y C4B se localizan dos genes que codifican para la expresión de la enzima 21 hidroxilasa, la cual hidroxila el carbono 21 en la biosíntesis del cortisol (9). El HLA es el sistema genético más polimórfico del ser humano. Hasta la fecha se han identificado claramente 158 antígenos HLA a nivel de la proteína: 27 HLA-A; 59 HLA-B; 10 HLA-C; 21 HLA-DR; 9 HLA-DQ y 6 HLA-DP. A nivel del DNA este polimorfismo es aún más elevado por ejemplo del gen HLA-A2 existen 17 variantes (A*0201-A*0217) y del HLA-B35 en México existen 16 variantes (B*3501-B*3516) a nivel de la secuencia de nucleótidos (10,11).

En relación a la nomenclatura un antígeno se identifica por la letra del locus y un número (p. Ej., A1, B51, Cw8, DR4, etc). Un alelo se identifica por la letra del locus un asterisco y un número (p. Ej., A*0101, B*0501, Cw*0401, DRB1*0401, etc) (12).

Los genes del HLA se heredan en forma codominante, de tal forma que cada haplotipo es transmitido por la madre y por el padre. Se desconoce el mecanismo que dio lugar a este extenso polimorfismo, por lo que se han propuesto dos hipótesis que tratan de explicarlo. La primera es la de “deriva aleatoria”, la cual explica que el polimorfismo se debe a las variaciones al azar de una estructura genética básica y que dicha variación tiene una cierta frecuencia dentro de una población determinada. La segunda de “selección natural” la cual propone que existe selección de los genes polimórficos sobre los monomórficos. Es probable que ambos mecanismos participan en el desarrollo del polimorfismo que caracteriza a los genes del MHC. La trascendencia del micropolimorfismo es que le confiere a la especie un enorme repertorio de elementos de reconocimiento para la gran variedad de antígenos ambientales y, por lo tanto una gran diversidad en la capacidad para activar respuestas inmunitarias contra los patógenos que podrían acabar con la especie, dando así, una ventaja selectiva (13).

Factores genéticos de Diabetes mellitus tipo 1.

Diversos estudios han demostrado que los genes HLA clase II, principalmente DQ y DR, constituyen un factor de riesgo importante en la inmunopatogénesis de la diabetes mellitus tipo 1. Los alelos de susceptibilidad son DQB1*0302, DQA1*0301 y 0501, el de mayor protección es DQB1*0602 y algunos autores también mencionan DQA1*0102 (14). Así mismo DR3 y DR4 están asociados específicamente en poblaciones caucásicas; los pacientes heterocigotos HLA DR3/DR4 presentan un riesgo 7-10 veces mayor que los homocigotos DR3/DR3 o DR4/DR4 (15). En japoneses se han asociado los HLA DR4 y DR9 y en chinos DR3 junto con DR9 (16). En un estudio realizado en población mexicana se encontraron como haplotipos protectores a DRB1*1101, DQA1*0501, DQB1*0301, DRB1*1402 y DQA1*0503 (17).

También se ha observado que alelos sin la presencia de ácido aspártico en la posición 57 de la cadena beta del HLA DQ confiere mayor susceptibilidad, un riesgo 100 veces mayor ante la ausencia homocigota (18,19). Por otro lado, la presencia de arginina en la posición 52 de la cadena alfa del HLA DQ también brinda susceptibilidad a la enfermedad (20). El 95% de los pacientes caucásicos con DM 1 son DR3 y/o DR4 vs. 40% de la población general. Diversos estudios reportan asociaciones de DM 1 y HLA DR4 con razones de momios desde 6 hasta a 10.8 y para DR3 de 3 a 6 (14).

DM 1 muestra una relación negativa con HLA-DR2 (RM = 0.25), es decir, este marcador protege contra el desarrollo de la enfermedad (30).

En un grupo de pacientes mexicanos mestizos con DM 1 se encontró asociación con DR3, DR4, DQ2 y DQ8; y como genes protectores se reportaron DR11, DR15, DQ5-6-7 (21). La susceptibilidad para desarrollar DM 1 atribuida al aspecto genético representa menos del 50%, pues el riesgo en gemelos monocigóticos para presentar la enfermedad si uno está afectado es menor a tal porcentaje, con lo cual se demuestra el importante efecto de los factores ambientales en el desarrollo de DM 1 (22).

Aproximadamente 80-90% de los pacientes al momento del diagnóstico tienen anticuerpos positivos contra células de los islotes, los cuales pueden ser detectados 12 años antes de manifestar la enfermedad; el mismo porcentaje se ha reportado para anticuerpos contra GAD (Descarboxilasa del Ácido Glutámico) y también se consideran estos anticuerpos como marcadores predictivos entre familiares no diabéticos para desarrollar la enfermedad. Sólo el 30-40% de los pacientes tienen anticuerpos positivos vs. Insulina (23).

Factores genéticos y etiológicos de diabetes mellitus tipo 2.

En la DM 2 el problema inicial es la resistencia a la insulina y hay 4 factores que influyen en la sensibilidad a la insulina: La Adolescencia porque disminuye un 30% la sensibilidad a la insulina al incrementar importantemente la producción de GH (hormona de crecimiento), el Sexo (las mujeres tienen más resistencia a la insulina por el índice de masa corporal), el origen Etnico (35-40% menos sensibilidad los afroamericanos) y la composición corporal (mayor proporción de grasa visceral en relación a la subcutánea). Después del desarrollo inicial de resistencia a la insulina reflejada por niveles elevados de insulina en ayuno se observa una secreción deficiente de ésta en su primer fase (24). Generalmente, los niños con diabetes mellitus tipo 2 presentan sobrepeso, tienen familiares de 1er. o 2º. grado con DM 2; su origen es afroamericano, indoamericano o hispano, hay signos de resistencia a la insulina o condiciones asociadas a ésta (acanthosis nigricans, hipertensión, dislipidemia, síndrome de poliquistosis ovárica), la edad de inicio suele ser a los 10 años o inicio de la pubertad aunque se han reportado casos desde los 4 años de edad (25). Los análisis de segregación no han sido productivos para identificar enfermedades poligénicas como DM2, sin embargo, en Bélgica se estudió un grupo de 214 pacientes con esta enfermedad y se comparó con un grupo control de 200 sanos y se demostró que genotipos homocigotos particulares de TNF alfa y alotipos GM y KM epistáticamente interactúan con HLA DQ alfa1(Arg52) y contribuyen a un riesgo incrementado de DM2 (26). Un estudio en Finlandia analizó la prevalencia de familias con DM1 y DM2 y se buscó una asociación entre pacientes con DM2 y sus antecedentes familiares con DM1, anticuerpos contra GAD, genotipos HLA DQB1; se observó que los pacientes con DM2 de familias con mezclas de DM1/DM2 tuvieron anticuerpos GAD positivos en un 18%, estadísticamente significativo al compararse con pacientes con DM2 de familias con sólo

DM2 (8%) y DQB1*0302/X genotipo (25% vs 12%); se concluyó que se agrupan en una misma familia tanto DM1 como DM2 y que existe una posible interacción genética mediante el HLA en estos 2 tipos de diabetes (27). También se ha encontrado que TNF alfa está asociado con una predisposición a una progresión a dependencia de insulina en pacientes diabéticos inicialmente diagnosticados como tipo 2 con anticuerpos GAD y DRB1*1502 DQB1*0601, la determinación de tales genotipos puede servir para mejor predicción de su curso clínico (28). Un estudio finlandés cuestiona el que las diferencias etiológicas (incluyendo asociación con antígenos del sistema HLA) entre diabetes mellitus 1 y 2 sean tan marcadas (29).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Existe asociación entre los genes de los alelos del HLA clase II-DR y diabetes mellitus tipo 1 y tipo 2 en niños mestizos mexicanos?

¿Hay diferencias entre las frecuencias génicas del HLA clase II-DR entre niños con diabetes mellitus tipo 1 y diabetes mellitus tipo 2?

JUSTIFICACIÓN

Actualmente ha aumentado la incidencia de DM tipo 2 a nivel mundial, lo cual se ha atribuido al aumento de obesidad por incremento del sedentarismo y dietas inadecuadas, así como a ciertos factores como la edad, el sexo y el origen étnico, sin embargo, no hay estudios en niños en los que se hayan investigado asociaciones entre los genes del HLA clase II y la presencia de DM 2. La determinación de estos genes puede diferenciar los aspectos genéticos que intervienen en los niños con diabetes tipo 1 y tipo 2, así como también establecer si son útiles como factores pronóstico en la evolución clínica de los 2 tipos de diabetes mellitus, lo cual se investigará en un estudio de prospectivo posteriormente. En México y a nivel mundial no existen estudios que analicen las diferencias inmunogenéticas en estos 2 tipos de diabetes en niños porque hasta hace algunos años era extremadamente rara la presencia de diabetes tipo 2 en niños. En la Clínica de Diabetes del Hospital Infantil de México tenemos registrados 300 niños con diabetes mellitus, de los cuales 30 (el 10%) padecen la tipo 2.

OBJETIVOS

Primario:

Determinar la asociación entre las frecuencias génicas del HLA clase II y diabetes mellitus tipo 1 y tipo 2 en niños mestizos mexicanos.

Secundario:

Identificar diferencias de las frecuencias génicas del HLA clase II entre niños con DM 1 y DM 2.

HIPÓTESIS

PRIMARIA

Existe asociación entre genes de los alelos del HLA clase II y diabetes mellitus tipo 1 y tipo 2 en niños mestizos mexicanos.

SECUNDARIA

Hay diferencias en las frecuencias génicas de los alelos del HLA clase II entre niños con diabetes mellitus tipo 1 y tipo 2

PACIENTES Y MÉTODOS

Tipo de estudio: Casos y controles.

Se diseñó este estudio considerando que la diabetes mellitus representa una baja prevalencia en niños (1 x 2500 niños menores de 5 años), así como para establecer fuerzas de asociación entre marcadores del HLA y el desarrollo de la enfermedad.

Población:

- Casos: Se estudiaron 72 niños mestizos mexicanos con diagnóstico de diabetes mellitus tipo 1 y 28 con diabetes mellitus tipo 2 de la consulta externa de la Clínica de Diabetes del Hospital Infantil de México.

- Criterios de inclusión:

Niños de ambos sexos.

Menores de 18 años.

Mestizos mexicanos: Nacidos en México al igual que sus 2 últimas generaciones

Criterios diagnósticos de diabetes mellitus (DM) tipo 1 y tipo 2.

Criterios de exclusión:

Portadores de otro tipo de enfermedades autoinmunes o padecer otros tipos de diabetes (secundaria o MODY) y que no acepten participar en el estudio.

- **Controles:** Se estudiaron 99 individuos sanos mestizos mexicanos (nacidos en México al igual que sus 2 últimas generaciones), provenientes de población abierta, sin la presencia de antecedentes heredofamiliares de enfermedades autoinmunes (tiroiditis, diabetes mellitus tipo 1, artritis reumatoide, etc.).

Cálculo del tamaño de muestra:

$$p1 = \frac{(RM) p2}{(RM) p2 + (1-p2)}$$

$$n = \frac{[Z_{1-\alpha/2} \sqrt{2 p2 (1-p2)} + Z_{1-\beta} \sqrt{p1 (1-p1) + (1-p2)}]^2}{(p1 - p2)^2}$$

| | |
|--|--------------|
| Nivel de significancia estadística $\alpha = 0.05$ | $p1 = 0.155$ |
| $Z_{1-\alpha/2} = 1.96$ | $p2 = .05$ |
| $Z_{1-\beta} = 0.84$ | $RM = 3.5$ |
| Poder = 0.80 | |

Al realizar el despeje se obtiene un tamaño de muestra de 65 pacientes para DM 1, pero fue posible incluir 72 pacientes.

No es posible calcular tamaño de muestra para pacientes con DM 2, pues no existen previos estudios previos, por lo tanto se analizaron todos los niños con DM 2 registrados en la Clínica de Diabetes del HIM.

VARIABLES.

A. Variable independiente: Genes del HLA clase II DR y DQ.

B. Variable dependiente: Diabetes mellitus tipo 1 y tipo 2.

C. Variables universales: Sexo, Edad, Origen, Antecedentes familiares.

DEFINICIÓN CONCEPTUAL Y OPERATIVA DE VARIABLES.

- Genes del HLA clase II: Localizados en el brazo corto del cromosoma 6 hacia la posición centromérica. Se determinarán los loci DRB1. Se medirán como presente o ausente para cada DR específico. Variable independiente dicotómica.
- Diabetes mellitus tipo 1: Estado hiperglucémico de origen autoinmune en el cual participan factores ambientales y genéticos, se presenta destrucción de células beta pancreáticas y por lo tanto, se requiere de insulina toda la vida, generalmente presentan anticuerpos positivos y péptido C normal o bajo, con o sin antecedentes familiares.
- Diabetes mellitus tipo 2: Estado hiperglucémico en el cual hay resistencia a la insulina y/o secreción deficiente de insulina por factores ambientales en personas con predisposición genética, no dependen de insulina, tienen anticuerpos negativos y péptido C normal o elevado, así como antecedentes familiares fuertemente positivos.

- Sexo: Masculino vs. Femenino
- Origen: DF, Edo. de México u otro estado de la república mexicana.
- Edad: De 1 a 18 años de edad.
- Antecedentes familiares de DM: No. de miembros de 1er, 2ª. y 3ª. generaciones con DM 1 o DM 2.

PROCEDIMIENTO.

El estudio se realizó en el Hospital Infantil de México en la Clínica de Diabetes en donde se invitó a participar a todos los niños con DM 1 y 2 que cumplieran con los criterios de inclusión, de quienes se consignó nombre, sexo, edad, origen y antecedentes familiares así como el tipo de diabetes, datos clínicos, etc (anexo 1).

No se utilizó muestreo alguno porque no se trata de un estudio de intervención. Posteriormente, previa carta de consentimiento autorizada (anexo 2), se les extrajo una muestra de sangre (5 ml), depositándose en un tubo con anticoagulante EDTA, previa autorización por escrito. La selección de los pacientes se efectuó por la autora y la Dra Ninel. Coyote Estrada (jefe de servicio de Endocrinología) y la toma de muestras por la autora o residentes encargados de toma de muestras para los estudios de rutina

Los tubos se conservaron a 4 grados Celsius y cada semana se trasladaron al INCMN para realizar la extracción de DNA lo antes posible.

Técnicas de biología molecular (38-42):

- a) Extracción de DNA mediante la técnica de fenol-cloroformo.
- b) Cuantificación del DNA por medio de espectrofotometría.
- c) Realización de reacción en cadena de la polimerasa utilizando secuencias específicas para cada alelo clase II.
- d) Hibridización y marcaje con oligonucleótidos alelo-específicos.
- e) Interpretación de los datos.

Estas técnicas ya están estandarizadas y validadas en el INCM y N (Anexo 3).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó el cálculo de frecuencias génicas a partir de la frecuencia de cada gen o alelo respecto al total de $2N$ (uno del padre y otro de la madre).

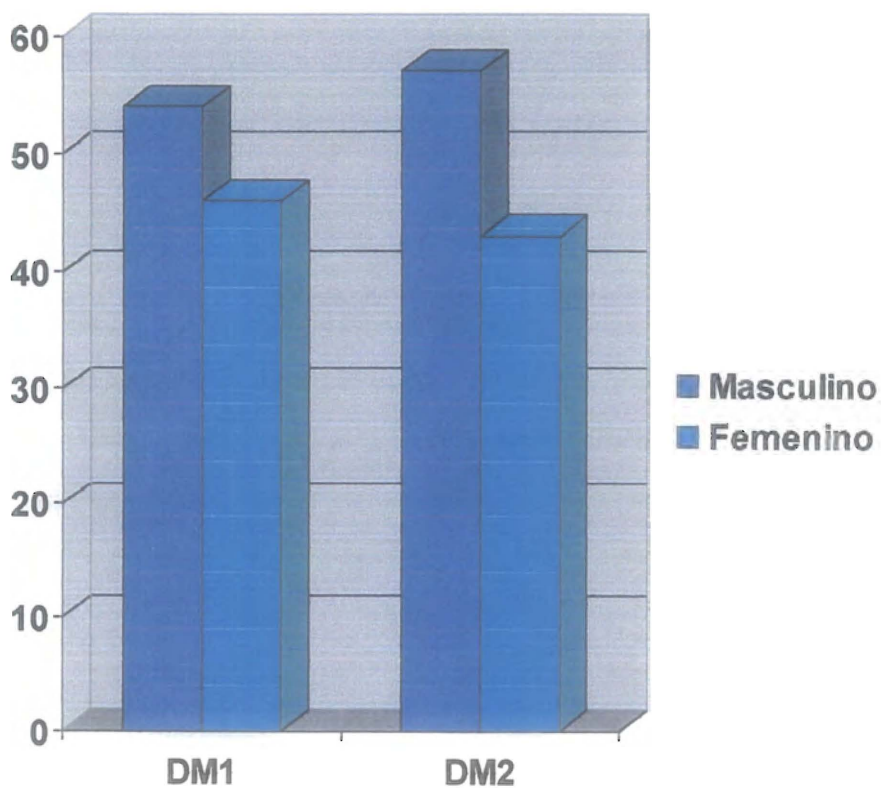
El análisis de asociación de la frecuencia de cada alelo del HLA se realizó mediante tablas de contingencia de 2×2 y se aplicó la prueba de χ^2 cuadrada; en casos con datos en celdillas menor a 5 se utilizó prueba exacta de Fisher. La fuerza de asociación en las tablas 2×2 se determinó con Razón de Momios (RM), en la cual una cifra mayor de 1 es asociación positiva o de susceptibilidad y menos de 1 es negativa o de protección.

RESULTADOS

Epidemiología

En el grupo de estudio se encontró leve predominio por el sexo masculino en ambos tipos de diabetes mellitus.

Figura 1. Género de pacientes con diabetes mellitus tipo 1 y tipo 2.



En los niños con DM1 la edad promedio al diagnóstico fue de 8.9 años, el promedio de la edad actual es de 13.4 años y el correspondiente a los años de evolución fue de 4.5 años. En los niños con DM2 la edad promedio al diagnóstico fue de 11.7 años, el de la edad actual de 14.2 años y el correspondiente a los años de evolución fue de 2.7 años.

Figura 2. Edad de inicio y años de evolución de pacientes con DM 1 y DM 2.

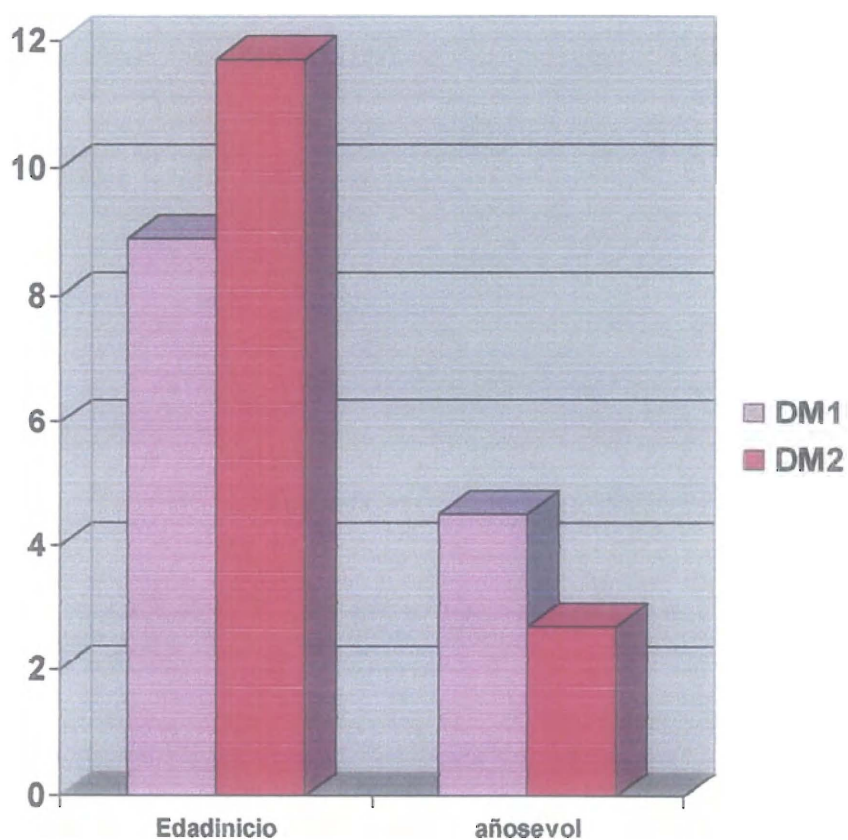


Tabla 1. Características clínicas de niños con Diabetes mellitus tipo 1 (DM1) y Diabetes mellitus tipo 2 (DM2)

| | DM1 N=72 | DM2 N=28 |
|---------------------------------|-------------|-------------|
| Sexo (M:F) | 39: 33 | 16: 12 |
| Edad al Dx (media) | 8.9±2.6 | 11.7±2.3 |
| Edad actual (media) | 13.4±3.03 | 14.2±2.05 |
| Años evolución (media) | 4.5±2.29 | 2.7±1.56 |
| Inicio con CAD ¹ | 50% | 25% |
| AHF DM1 | 10% | 5% |
| AHF DM2 | 77% | 89% |
| HbA1 Total (media) ² | 9.95% | 8.8% |

1. CAD: Cetoacidosis diabética

2. HbA1: Hemoglobina glucosilada

Correlación clínica y genética.

Tabla 2. Características clínicas de niños con DM tipo 2 y su genotipo HLA-DR.

| SEXO | EDADdx | EDADact | AÑOSev | CADdx | AHFDM1 | AHFDM2 | HLA-DR |
|------|--------|---------|--------|-------|--------|--------|-----------|
| M | 13 | 16 | 3 | Neg | Neg | + | DR4/DR8 |
| F | 9 | 15 | 6 | Neg | Neg | + | DR15/DR16 |
| F | 13 | 15 | 2 | Neg | Neg | + | DR13/DR8 |
| M | 14 | 18 | 4 | + | Ncg | + | DR3/DR14 |
| F | 11 | 14 | 3 | Neg | Neg | + | DR4/DR7 |
| M | 8 | 10 | 2 | Neg | Neg | + | DR4/DR8 |
| M | 15 | 16 | 1 | Neg | Neg | + | DR3/DR13 |
| M | 13 | 16 | 3 | + | Neg | + | DR3/DR4 |
| M | 12 | 15 | 3 | Neg | Neg | + | DR15/DR8 |
| M | 12 | 14 | 2 | + | Neg | + | DR4/DR8 |
| F | 13 | 15 | 2 | + | Neg | + | DR13/DR14 |
| M | 14 | 18 | 4 | Neg | Neg | + | DR14/DR8 |
| M | 13 | 14 | 1 | Neg | Neg | + | DR1/DR8 |
| M | 11 | 16 | 5 | Neg | Neg | + | DR4/DR8 |
| F | 12 | 13 | 1 | + | Neg | + | DR4/DR4 |
| F | 14 | 15 | 1 | Neg | Neg | + | DR16/DR7 |
| M | 9 | 11 | 2 | Neg | Neg | + | DR14/DR7 |
| M | 6 | 11 | 5 | Neg | Neg | + | DR16/DR13 |
| F | 15 | 18 | 3 | + | Neg | + | DR1/DR4 |

| | | | | | | | |
|---|----|----|---|-----|-----|---|----------|
| M | 12 | 13 | 1 | Neg | Neg | + | DR7/DR8 |
| F | 13 | 18 | 6 | Neg | Neg | + | DR13/DR8 |
| F | 15 | 16 | 1 | Neg | Neg | + | DR13/DR7 |
| M | 14 | 15 | 1 | Neg | Neg | + | DR4/DR4 |
| F | | | | | | | DR1/DR3 |
| M | 15 | 16 | 1 | + | Neg | + | DR8/DR8 |
| M | 16 | 17 | 1 | Neg | Neg | + | DR4/DR7 |
| F | 10 | 14 | 4 | Neg | + | + | DR3/DR11 |
| M | 9 | 14 | 5 | Neg | Neg | + | DR3/DR8 |

Estudio de los alelos.

Los alelos HLA-DR4 y DR3 se encontraron aumentados de manera estadísticamente significativa en el grupo de niños con DM1 al compararse con el grupo control ($pC = 0.0000001$, $RM=3.59$ $IC95\% = 2.2-5.8$ y $pC = 0.00009$, $RM = 4.66$, $IC95\% = 2.15-10.3$, respectivamente) tal como se ilustra en la tabla 2.

Al comparar los alelos de los niños con DM 2 con los DM 1 se observó disminución del alelo HLA-DR4 ($pC = 0.0006$, $RM = 0.24$, $IC95\% = 0.11-0.53$) y aumento de la frecuencia génica del alelo HLA-DR8 ($pC = 0.0001$, $RM = 10.58$, $IC95\% = 3-40.8$).

El genotipo más frecuente del HLA clase II en niños con DM1 correspondió al DR3/DR4, al detectarse en 23 pacientes (32%) mientras que el DR4/DR4 se obtuvo en 20 pacientes (27.7%).

En el grupo de los niños con DM2, el genotipo más frecuente fue DR4/DR8 (4 pacientes - 14.2%-) seguido del DR6/DR8 (3 pacientes -10.7%-).

Por último, cabe mencionar que al realizar la comparación de las frecuencias génicas de los alelos HLA en niños con DM tipo 2 y controles sanos, no se observaron diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 3. Frecuencias génicas de los alelos HLA-DR en pacientes con DM y controles sanos.

| | DM1 N=72 | | DM2 N=28 | | Sanos N=99 | |
|------|-------------|--------------------|-------------|--------------------|---------------|-------|
| | N | gf | N | gf | N | gf |
| DR4 | 76 | 0.528 ¹ | 12 | 0.214 ³ | 47 | 0.237 |
| DR3 | 31 | 0.216 ² | 6 | 0.107 | 11 | 0.055 |
| DR13 | 11 | 0.076 | 6 | 0.107 | 10 | 0.050 |
| DR7 | 5 | 0.035 | 6 | 0.107 | 22 | 0.111 |
| DR16 | 5 | 0.035 | 3 | 0.053 | 5 | 0.025 |
| DR8 | 4 | 0.028 | 13 | 0.232 ⁴ | 33 | 0.165 |
| DR9 | 3 | 0.021 | 0 | 0 | 3 | 0.015 |
| DR11 | 2 | 0.013 | 1 | 0.017 | 20 | 0.100 |
| DR14 | 2 | 0.013 | 4 | 0.071 | 21 | 0.109 |
| DR1 | 1 | 0.006 | 3 | 0.053 | 10 | 0.050 |
| DR10 | 1 | 0.006 | 0 | 0 | 3 | 0.015 |
| DR12 | 1 | 0.006 | 0 | 0 | 2 | 0.010 |
| DR15 | 0 | 0 | 2 | 0.035 | 13 | 0.065 |

DM1 vs Controles

- 1 pC = 0.0000001, RM=3.59 IC95% = 2.2-5.8
- 2 pC = 0.00009, RM = 4.66 IC95% = 2.15-10.3

DM2 vs DM1

3. pC = 0.0006, RM = 0.24, IC95%= 0.11-0.53
4. pC = 0.0001, RM = 10.58, IC95% = 3-40.8

DISCUSION

Este trabajo determina por primera vez los alelos del HLA clase II en niños con diabetes mellitus tipo 2 y compara también por primera vez dichos alelos con los correspondientes en niños con diabetes mellitus tipo 1, todos ellos pacientes de un mismo hospital.

Nuestros resultados apoyan la asociación entre genes del HLA clase II y la diabetes mellitus tipo 1, pues encontramos una RM de 3.6 para DR4 y de 4.6 para DR3, similar a lo reportado en estudios previos (14, 17, 20). Se encontraron los mismos alelos del HLA reportados en los caucásicos, lo cual sugiere que dichos genes fueron adquiridos por el mestizaje con otras poblaciones, ello se explica por la baja frecuencia del HLA-DR3 en la población mestiza Mexicana, la cual es reportada en el 5% y más aún en la población indígena este alelo no se encuentra presente (14). En relación al HLA-DR4 será importante realizar subtipos de este alelo con el objeto de definir su origen, ya que en la población mestiza e indígena de México, el subtipo HLA-DRB1*0407 es el más común mientras que el subtipo más comúnmente asociado a la DM tipo 1 es el HLA-DRB1*0401.

El fenotipo DR3/DR4 y el estado homocigoto DR4 se encontraron aumentados de manera estadísticamente significativa con RM de 15 y 5 respectivamente, lo cual confirma lo reportado en otros estudios de poblaciones caucásicas.

Así mismo, se encontró que el alelo HLA-DR7 estuvo disminuido de forma estadísticamente significativa, lo cual sugiere un efecto protector para el desarrollo de esta enfermedad, sin embargo, se han reportado otros alelos del HLA clase II con efecto protector, como el HLA-DR2 en caucásicos (30).

Esta diversidad en los alelos protectores en diversos grupos étnicos se explica básicamente debido a la genética de población de cada uno de los grupos, ya que en México se ha reportado que el HLA-DR7 es el tercer alelo más frecuente (11%) en la población mestiza mexicana (31).

Por otro lado, al comparar los genes del HLA clase II en niños con diabetes mellitus tipo 2 no se encontró asociación, lo cual sugiere que el mecanismo fisiopatológico es diferente al que se presenta en la diabetes mellitus tipo 1 cuya etiopatogenia es de origen autoinmune. Sin embargo, varios estudios han encontrado una posible interacción genética entre DM1 y DM2 mediada por el HLA; por ejemplo, un estudio en Finlandia comparó diabéticos tipo 2 con familiares diabéticos tipo 1 y sólo con familiares diabéticos tipo 2, encontrando que los primeros eran menos obesos, tuvieron un inicio más temprano de la diabetes, concentraciones más bajas del péptido C, recibieron insulina de forma temprana y tuvieron DR4 con mayor frecuencia (32), así mismo, un trabajo realizado en Minnesota reportó que padres con DM 2 e hijos con DM 1 comparten la presencia del HLA-DR4 (33), otro estudio realizado en Suecia también demostró que una historia familiar de ambos tipos de diabetes influye sobre el fenotipo de los pacientes con DM 2 (34). En otro estudio se observó que pacientes con DM2 diagnosticados antes de los 35 años presentaron DR3 como marcador de progresión temprana a requerimientos de insulina (35). En el estudio de Forsblom y cols. se encontró que el HLA-DR4 y signos de autoinmunidad se asociaron con riesgo cardiovascular disminuido (36). En otro trabajo se observó mayor frecuencia del HLA DR3 y DR4 en pacientes diabéticos tipo 2 que debutaron con cetoacidosis (37).

Por todo lo anterior, es conveniente realizar un estudio de cohorte en estos pacientes con el fin de evaluar una posible asociación de estos marcadores inmunogenéticos con el curso clínico de la enfermedad.

Es importante resaltar que al buscar diferencias entre los genes del HLA clase II de niños diabéticos tipo 2 con respecto a los niños diabéticos tipo 1 se encontró un incremento de forma estadísticamente significativa de DR8 y una disminución estadísticamente significativa de DR4, lo cual podría ser de gran utilidad para tener un elemento más de diferenciación entre los niños diabéticos tipo 1 y tipo 2, pues en ocasiones las características clínicas son tan similares que se dificulta hacer el diagnóstico específico de manera correcta.

CONCLUSIONES

1. Existen diferencias genéticas entre diabetes mellitus tipo 1 y tipo 2 en niños mestizos mexicanos, lo cual resulta de utilidad para diferenciar ambos tipos de diabetes en niños.
2. DR4 y DR8 pueden ser de gran ayuda para diferenciar ambos tipos de diabetes en niños cuyas características clínicas causen confusión para establecer el tipo exacto de diabetes.
3. Los alelos HLA-DR3 y DR4 están asociados con el riesgo de desarrollar DM tipo 1, mientras que el HLA-DR7 se asoció a un efecto protector.

BIBLIOGRAFIA

1. Wilson JD, Foster DW, Kronenberg HM, Larsen R. Williams Textbook of Endocrinology. USA. 1998. 9a.ed. pp.973-1059.
2. Expert Committee on the diagnosis and classification of Diabetes Mellitus. Diabetes Care. 1997; 20: 1183-98.
3. Sperling MA. Aspectos de etiología, predicción y prevención de la diabetes insulín dependiente en niños. *Pediatr Clin North Am.* 1999; 285-302.
4. DeFronzo RA. Pharmacologic therapy for type 2 Diabetes Mellitus. *Annals Int Med.* 1999; 131(4):281-301.
5. Natarajan Anuja. Combining metformin with a thiazolidinedione in children with type 2 diabetes. *American Academy of Pediatrics Annual Meeting.* 2000.
6. Trowsdale J, Ragoussis J, Campell RD. Map of the human major histocompatibility complex (MHC). *Immunology Today* 1991; 12:443-6.
7. Heinriche H, Orr HT. HLA non A, B, C class I genes: their structure and expression. *Immunol Res* 1990; 9:265-74.
8. Cloegh HL, Orr HT, Strominger JL. Major histocompatibility antigens: the human (HLA-A, B, C) and murine (H2-K, H2-D) class I molecules. *Cell* 1981; 42:287-99.
9. White P, New M, Dupont B. Structure of human steroid 21-hydroxylase genes. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1986; 83:5111-5.
10. Browning M, Krausa P. Genetic diversity of HLA-A2: evolutionary and functional significance. *Immunology Today* 1996; 17:165-70.

11. Vargas-Alarcón G, Alvarez M, Martínez-Laso J, Granados J, Díaz-Campos N, Gómez-Casado E, Alcocer-Varela J, Arnaiz-Villena A. A new HLA-B35 (B*3516) allele found in a Mexican of Nahua (Aztec) descent. *Immunogenetics* 1996; 43:244-5.
12. Bodmer JG, Marsh SGE, Albert ED, Bodmer WF, Dupont B, Erlich HA. Nomenclature for factor of HLA system. *Tissue Antigens* 1992; 39:1-13.
13. Klein J. Of HLA, types and selection: an assay on evolution of MHC and parasites. *Human Immunol* 1991; 30:247-58.
14. Gómez Pérez FJ, Rull JA. *Tratado de Diabetología*. Trillas Ed. México. 1997. 1ª.edición.
15. Lenmark A. Insulin dependent Diabetes Mellitus. Capítulo 3. *Clinical Diabetes Mellitus*. Davidson JK (Ed). Thieme Med Pub, 1991:35.
16. Bertera S, Alexander A, Giannoukakis N, Robbins PD, Trucco M. Immunology of type 1 Diabetes. *End Metab Clin* 28(4), 1999: 842-864.
17. Abstract Autoimmunity and Diabetes. Commentary. *J Clin End Metab*. 1999; 84(12):4371-78.
18. Sperling MA. Aspects of the etiology, prediction and prevention of insulin-dependent diabetes mellitus in childhood. *Pediatr Clin North Am*. 1997; 44:269-83.
19. Janeway CA Jr. Immunology relevant to diabetes. In: Porte D Jr, Sherwin RS, eds. *Ellenberg and Rifkin's Diabetes Mellitus*, 5a.ed. Stamford, CT: Appleton and lange; 1997:287-99.
20. Cucca F, Muntoni F, Lampis R, et al. Combinations of specific DRB1, DQA1, DQB1 haplotypes are associated with diabetes mellitus in Sardinia. *Hum Immunol*. 37:85-94. Abstract.

21. Gorodezky C, Olivares A, Debazo H, Rodríguez L, Altamirano N, Robles C. MHC-dependent molecular mechanisms of susceptibility and protection in type 1 diabetes in mexicans. *Gaceta Médica de México*. 1995;131(49):395-403.
22. Muir A, Schatz DA, Maclaren NK. The pathogenesis prediction and prevention of insulin-dependent Diabetes Mellitus. *End Metab Clin North Am*. 1992; 21:199-219.
23. Atkinson MA, Maclaren NK. What causes Diabetes? *Sci Am*. 1990; 7:42-9.
24. Pandey JP, Zamani M, Cassiman JJ. Epistatic effects of genes encoding tumor necrosis factor- α , immunoglobulin allotypes and HLA antigens on susceptibility to non insulin dependent (type 2) diabetes mellitus. *Immunogenetics* 1999; 49: 860-4.
25. American diabetes Association. Type 2 diabetes in children and adolescents. *Pediatrics* 2000; 105:671-682.
26. Silverstein JH, Rosenbloom AL. Treatment of type 2 diabetes mellitus in children and adolescents. *J Ped End Metab* 2000; 13: 1403-09.
27. Tuomilhto-Wolf E, Tuomilhto J, Hitman G, et al. Genetics susceptibility to non insulin dependent diabetes mellitus and glucose intolerance allocated in HLA region. *Lancet* 1993; 307: 2155-9.
28. Obayashi H, Hasegawa G, Fukui M, Kamiuchi K, Kitamura A, et al. Tumour necrosis factor microsatellite polymorphism influences the development of insulin dependency in adult-onset diabetes patients with the DRB1*1502-DQB1*0601 allele and antigliutamic acid decarboxylase antibodies. *J Clin End Metab* 2000; 85: 3348-51.
29. Haiyan L, Eero L, Peter A, et al. Possible human leukocyte antigen mediated genetic interaction between type 1 and type 2 diabetes. *J Clin End Met* 2001; 86: 574-82.

30. Yamamoto Furusho JK, Granados J. El complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y las enfermedades autoinmunes. *Revista colombiana de reumatología*. 1997;4:19-25.
31. Arnaiz-Villena A, Vargas-Alarcón G, Granados J, Gómez Casado E, et al. HLA genes in mexican maazatecans, the peopling of the Americas and the uniqueness of amerindians. *Tissue Antigens* 2000; 56:405-16.
32. Li H, Lindholm E, Alegren P et al. Possible Human Leukocyte Antigen-Mediated Genetic Interaction between Type 1 and Type 2 Diabetes. *J Clin Endocrinol and Metab* 2001; 86: 574-582.
33. Rich SS, Panter SS, Goetz FC, Hedlund B, Barbosa J. Shared genetic susceptibility of type 1 (insulin-dependent) and type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: contributions of HLA and haptoglobin. *Diabetología* 1991; 34:350-5.
34. Li H, Isomaa B, Taskinen MR, Groop L, Tuomi T. Consequences of a family history of type 1 and type 2 diabetes on the phenotype of patients with type 2 diabetes. *Diabetes care* 2000; 23:589-94.
35. Kelly MA, Chan JC, Heward J, Mijovic CH, et al. HLA typing and immunological characterization of young-onset diabetes mellitus in a Hong Kong Chinese population. *Diabet Med* 2001; 18:22-8).
36. Forsblom CM, Sane T, Groop PH, et al. Risk factors for mortality in Type II (non-insulin-dependent) diabetes of a role for neuropathy and a protective effect of HLA-DR4. *Diabetología*. 1998;41:1253-62.

37. Banerji MA, Chaiken RL, Huey H, et al. GAD antibody negative NIDDM in adult black subjects with diabetic ketoacidosis and increased frequency of human leukocyte antigen DR3 and DR4. Flatbush diabetes. *Diabetes*; 1994; 43:741-5
38. Miller S, Dykes D, Polesky H. A simple salting-out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16: 1215-20.
39. Todd JA, Bell JI, McDevitt HO. HLA-DQ beta gene contributes to susceptibility and resistance to insulin dependent diabetes mellitus. *Nature* 1987; 329:599-606.
40. Kimura A, Dong RP, Harada H, Sasazuki T. DNA typing of HLA class II genes in B-lymphoblastoid cell lines homozygous for HLA. *Tissue Antigens* 1992; 40: 5-15.
41. Bodmer JG, Marsch SGE, Albert ED, Bodmer WF, Dupont B, Erlich HA. Nomenclature for factors of HLA system. *Tissue Antigens* 1995; 46:1-18.
42. Kessler C, Holtke HJ, Selbi R, Burg J, Muhlegger K. Non radioactive labelling and detection of nucleic acids. A novel DNA labelling and detection system based on digoxigenina antidigoxigenina ELISA principle. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 1990; 371: 917-27.

ANEXO 1

HOJA DE RECOLECCION DE DATOS.

Nombre: _____ . Sexo: _____

Diagnóstico: (DM 1) (DM 2) (Control sano) Origen: _____

Fecha del diagnóstico:

Fecha de nacimiento:

Edad al diagnóstico:

Edad actual:

Antecedentes heredofamiliares de Diabetes mellitus tipo 1:

Abuelos o Tíos abuelos: (Sí) (No) No. de afectados _____

Padres o Tíos: (Sí) (No) No. de afectados _____

Hermanos o primos: (Sí) (No) No. de afectados _____

Hijos o sobrinos: (Sí) (No) No. de afectados _____

Antecedentes heredofamiliares de Diabetes mellitus tipo 2:

Abuelos o Tíos abuelos: (Sí) (No) No. de afectados _____

Padres o Tíos: (Sí) (No) No. de afectados _____

Hermanos o primos: (Sí) (No) No. de afectados _____

Hijos o sobrinos: (Sí) (No) No. de afectados _____

Tipo de alimentación por día:

Proteínas de origen animal (carne -res, pollo- jamón, huevo, quesos, etc.): _____

Tortillas, pan o cereal: _____

Leche o yoghurt: _____

Frutas: _____

Verduras tipo A: _____

Verduras tipo B: _____

Leguminosas: _____

Refrescos: _____

Papitas, palomitas, chicharrones: _____

Galletas, helados, pasteles: _____

Ejercicio rutinario (horas por semana): _____

Natación:

Fútbol:

Aeróbics:

Karate:

Otro:

No realiza.

Anticuerpos vs. GAD () vs. Células betha () vs. Insulina ()

Péptido C:

Tratamiento:

Peso: _____ Talla _____ IMC _____ Pc _____

HLA DR:

HLA DQ:

ANEXO 2
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO "FEDERICO GÓMEZ".
ENDOCRINOLOGÍA.

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO.

Asociación entre genes del HLA clase II y diabetes mellitus tipo 1 y tipo 2 en niños mestizos mexicanos.

1. Se me ha informado sobre el estudio al cual invitan a participar a mi hijo (a) y he aceptado de forma voluntaria, pues me explicaron que desean investigar la presencia de genes (información de las células para formar cada parte del cuerpo) específicos que influyen en el desarrollo de la diabetes mellitus que padece mi hijo (a).
2. Se me informa que se deberá tomar una muestra de sangre de 4 ml a mi hijo(a) y que se tratará de hacer en el momento en el cual deba tomarse algún otro tipo de estudio.
3. Los resultados me serán comunicados en cuanto sea posible y serán confidenciales.
4. El material genético obtenido de la muestra de mi hijo(a) será utilizado sólo para fines de investigación y en beneficio del progreso de la ciencia.
5. Este estudio no conlleva riesgo alguno para mi hijo(a), aunque si pudiera presentar el desarrollo de un moretón en el área de la toma de muestra de sangre.
6. Se me informa que si NO acepto participar, no se afectará la atención recibida a mi hijo (a) en el hospital.
7. El costo del estudio será gratuito.

Nombre y firma del padre, madre o tutor.

Nombre y firma del testigo.

Nombre y firma del testigo.

Firma del médico responsable: _____

Dra. Ana Lilia Rodríguez Ventura. Hospital Infantil de México.
Servicio de Endocrinología. Tel. 5228-9917, ext. 1500.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

ANEXO 3

EQUIPO, MATERIAL Y TÉCNICAS

EQUIPO:

- Campana de extracción.
- Termociclador.
- Lámpara de rayos ultravioleta.
- Incubadora para hibridación. Baño de agua.
- Fuente de vacío.
- Cámara fotográfica.

MATERIAL:

- Tubos Falcon de 50 ml estériles.
- Pipetas Pasteur.
- Micropipetas de 5, 20 y 100 ul.
- Tubos Ependorf de 2.5 ml.
- Bolsas de hibridación.
- Película de rayos X.
- Películas fotográficas.

REACTIVOS:

- Amortiguador salino de fosfatos.
- Solución de lisis AKC (NH_4Cl 0.155M + K_2CO_3 0.01 M).
- Solución RCB (NaCl 10mM + Tris-base 10mM + EDTA 25 mM).

- Amortiguador Tris-EDTA.
- Amortiguador de Tris-Base 0.5 M, pH=8.0.
- Solución de Duodecil sulfato de sodio (SDS) al 10%.
- Proteinasa K (10mg/ml).
- Fenol.
- Cloroformo.
- Alcohol etílico absoluto.
- Iniciadores derecho e izquierdo.
- Cloruro de Magnesio.
- Deoxinucleótidos (ATP, CTP, GTP, TTP).
- Taq polimerasa.
- Agarosa al 1%.
- Bromuro de etidio (10mg/ml).
- Solución de naranja G (10 ml de Ficoll al 20%, 2 grs de Tris-base y suficiente natanja G para dar color).
- Hidróxido de sodio NaOH 0.5M.
- Cloruro de sodio NaCl 1.5 M.
- Tris-base 0.5 M pH=7.4.
- Terminal transferasa.
- Cloruro de cobalto CoCl 25 mM.
- Oligonucleótidos (sondas) en concentración de 10 pmoles/ul.
- Digoxigenina (ddUTP-Dig) en concentración de 1 nmol/ul.

- EDTA 0.2 M pH=8.0.
- Glucógeno.
- Cloruro de litio LiCl 4M.
- Etanol al 70%.
- Membranas de Nylon.
- Solución de hibridación. SSPE 6X, solución Denhardt 5X, Lauril-sarconine de sodio 0.1%, SDS 0.02%.
- SSPE 30X: NaCl 4.5 M NaH₂PO₄ 0.3M, EDTA 30 mM.
- Solución Denhardt: PVP y Ficoll 400 al 2%, 2grs de albúmina sérica bovina.
- Solución de cloruro de tetrametil amonio 5M (TMAC).
- Solución de revelado 1: Acido maleico 0.1M, NaCl 0.15M.
- Solución de revelado 2: Amortiguador 1 más 0.3% de Tween 20.
- Solución de revelado 3: Solución de bloqueo diluída 1:10 en amortiguador 1.
- Solución de revelado 4: Tris-base 0.1M pH= 9.5, NaCl 0.1M y MgCl₂ 50mM.
- Solución de bloqueo: reactivo de bloqueo al 10% en amortiguador 1.
- Anticuerpo anti-digoxigenina acoplado a fosfatasa alcalina.
- Amortiguador de revelado 4: Tris 0.1M pH=9.5, NaCl 0.1M y MgCl₂ 50mM.
- Dioxetano.

TECNICAS:

Extracción de DNA (38).

1. Colocar 3-4 ml de sangre (EDTA) en un tubo Falcon de 50 ml.
2. Agregar 30 ml de PBS y centrifugar a 2,000 rpm durante 10 minutos.
3. Tirar el sobrenadante y al paquete agregarle 50 ml de solución de lisis (AKC), incubar por 30 minutos e inmediatamente centrifugar a 1500 rpm durante 10 minutos.
4. Descartar el sobrenadante y colocar PBS, agitar y centrifugar a 1500 rpm durante 5 minutos.
5. Descartar el sobrenadante y agregar AKC, agitar y centrifugar a 1500 rpm durante minutos.
6. Descartar el sobrenadante y agregar PBS, agitar y centrifugar a 1500 rpm durante 5 minutos.
7. Descartar el sobrenadante y agregar 3 ml de amortiguador RCB, 30 ul de SDS al 10% y 100ul de proteinasa K (10mg/ml). Incubar la mezcla durante la noche en baño maría a 65-70° C.
8. Al siguiente día, saturar el fenol utilizando Tris base 0.5 M pH= 8.0 volumen a volumen.
9. Sacar los tubos del baño y agregar a cada uno 3 ml de fenol saturado, agitar y centrifugar a 1500 rpm durante 5 minutos.
10. Obtener la fase acuosa y a ésta agregarle nuevamente 3 ml de fenol saturado, agitar y centrifugar a 1500 rpm durante 5 minutos.

11. Separar la fase acuosa y agregarle 2 ml de amortiguador de Tris-EDTA y 5 ml de cloroformo, agitar y centrifugar como en el paso anterior.
12. Obtener la fase acuosa y agregarle otros 5 ml de cloroformo, agitar y centrifugar. Este paso se repite hasta la fase acuosa quede cristalina.
13. Separar la fase acuosa y agregar NaCl 5M (la décima parte del volumen final, de manera que el NaCl quede a 0.5M en la solución).
14. La mezcla anterior se agita y se agrega etanol absoluto en proporción 1:4 V/V.
15. El DNA precipitado se separa en un tubo ependorf de 2.5 ml. Este DNA se lava con etanol absoluto, el cual se desecha. El DNA se deja secar ya sea con N₂ o a temperatura ambiente.
16. Una vez seco, el DNA se hidrata ya sea con tris-EDTA o con agua destilada y se guarda a -20° C hasta su uso.

II. Amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (39,40).

Se prepara una mezcla que contiene todo lo necesario para realizar la amplificación con lo siguiente:

- Agua 1762.5 ul.
- Amortiguador de PCR 10X 250 ul.
- Deoxinucleótido 2mM 250 ul.
- Iniciador derecho 50 ul.
- Iniciador izquierdo 50 ul.
- Agitar bien y ponerla en hielo
- Taq polimerasa 12.5 ul.

Antes de añadir la enzima a la mezcla, colocar 2ul (0.5ug) de los DNA en los tubos de PCR. Por último, añadir 47.5 ul de la mezcla anterior a cada tubo (mezclando DNA y solución) y agregar 2 gotas de aceite mineral.

Posteriormente los tubos son colocados en el termociclador, el cual se programa con las siguientes condiciones que son estandarizadas en el laboratorio:

- Desnaturalización 1 minuto a 94° C.
- Anillamiento 1 minuto a 60° C.
- Extensión 1 minuto 30 segundos a 72° C.
- Extensión final 7 minutos a 72° C.

El proceso se realiza durante 30 ciclos.

Una vez finalizado el proceso de amplificación, este es corroborado por medio de un gel de agarosa al 1%. Se mezclan 5 ul de cada muestra con 7 ul de colorante de naranja G. Esta mezcla se corre en el minigel de agarosa a 50 volts durante 30 minutos. Las bandas son observadas en un transiluminador UV y se compara su corrimiento con un marcador de peso molecular conocido.

Finalmente las muestras amplificadas son guardadas para realizar la hibridación. Los iniciadores que serán utilizados son aquéllos para la región genérica DRB1 sugeridos en el XI taller internacional de histocompatibilidad (41).

III. Marcaje de las sondas (42).

Cada sonda en cantidad de 95 picomoles es mezclada con 4 ul de amortiguador para la terminal transferasa, 4 ul de solución de CoCl₂ 25 mM, 1 ul de ddUTP-Dig (1nmol/ul) y 1,5 unidades de terminal transferasa. La mezcla se incuba a 37° C durante 30 minutos y después se coloca en hielo. Por otra parte, se mezcla 1 ul de glucógeno con 200ul de EDTA 0.2M pH=8.0 y a esta solución se añaden 2 ul a la mezcla inicial. El oligonucleótido marcado se precipita con 2.5 ul de LiCl 4M y 85 ul de etanol absoluto pre-enfriado a -20° C, se mezcla bien y se mantiene a -70° C durante 15 minutos y después a 20 o C durante 2 horas o toda la noche. Centrifugar a 12000 rpm durante 20 minutos a 4° C, eliminar y lavar el paquete con 60 ul de etanol. Centrifugar a 12000 rpm durante 10 minutos a 4° C, eliminar el sobrenadante y secar el tubo al vacío.

IV. Hibridación (42)

Tratamiento de la membrana: La membrana de nylon es cortada en cuadros de 10cm². La membrana se humedece en agua destilada, posteriormente se coloca en una solución de SSPE 10X durante 15 minutos. Se seca en el horno a 60° C, en cada cuadro de 1cm² se colocan 2 ul del DNA amplificado.

La membrana se seca a temperatura ambiente y luego en el horno a 80° C (puede fijarse el DNA utilizando un transiluminador de luz ultravioleta). Una vez colocado el DNA en la membrana se procede a desnaturalizarlo, colocando la membrana en una solución de NaOH 0.5M/NaCl 1.5M durante 5 minutos. Después de la desnaturalización, la membrana es neutralizada colocándola en una solución de NaCl 1.5M/tris-base 0.5M pH=7.4 durante un minuto. Finalmente la membrana se hornea a 80° C durante 10 minutos y se pone en un transiluminador de luz ultravioleta durante 3 minutos.

Hibridación: Las membranas que contienen el DNA amplificado son pre-hibridizadas en la solución correspondiente (0.1-0.2 ml/cm²) durante al menos 30 minutos a 42° C en baño maría y utilizando bolsas de plástico. Posteriormente las membranas son hibridadas en la solución para este efecto, la cual contiene el oligonucleótido marcado con digoxigenina (2 a 4 picomoles de sonda por cada ml de solución de hibridación). Esta solución también se agrega de 0.1 a 0.2 ml por cada cm² de membrana; este proceso se realiza a 42° C durante toda la noche. Las membranas son posteriormente lavadas en 2 ocasiones (5 minutos cada una) con una solución de SSPE 2X y SDS 0.1% a temperatura ambiente con agitación

utilizando para esto recipientes de plástico de tamaño apropiado a la membrana. Por lo general se utilizan de 50 a 100 ml de solución de lavado por cada 100cm² de membrana. Posteriormente la membrana se lava con una solución TMAC 3M durante 10 minutos a temperatura ambiente y finalmente se lava 2 veces con esta misma solución durante 15 minutos a 59° C.