

60  
lej.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

Facultad de Estudios Superiores CUAUTITLAN

Estudio Inmunogenético de  
Pacientes Mestizos Mexicanos  
con Espondiloartropatías

**T E S I S**

Que para obtener el título de

**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

Presenta

**GILBERTO VARGAS ALARCON**

Director de Tesis : DR. JULIO GRANADOS ARRIOLA

CUAUTITLAN, IZCALLI, EDO. DE MEX.

1988

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



## **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 está 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.

ABREVIATURAS Y ANCLAS

- AA. Anticuerpos antinucleares.
- AR. Artritis Reumatoide.
- C2. Segundo Componente del Complejo Complemento.
- C2A. Variante Ácida del Segundo Componente del Complemento.
- C2B. Variante Básica del Segundo Componente del Complemento.
- C2C. Variante Común del Segundo Componente del Complemento.
- C3. Tercer Componente del Sistema Complemento.
- C3b. Fracción "b" del Tercer Componente del Complemento.
- C4. Cuarto Componente del Sistema Complemento.
- C4A. Locus A del Cuarto Componente del Complemento.
- C4B. Locus B del Cuarto Componente del Complemento.
- C5a. Fracción "a" del Quinto Componente del Complemento.
- cM. Centimorgans.
- d. Daltons.
- EA. Espondilitis Anquilosante.
- EAJ. Espondilitis Anquilosante Juvenil.
- EAP. Espondiloartropatías.
- EDTA. Ácido Etilendiamino tetracético.
- fB. Factor B de la Vía Alternativa del Complemento.
- GLO I. Glioxalasa I.
- GLO 1. Alelo 1 de la Glioxalasa.
- GLO 2. Alelo 2 de la Glioxalasa.
- GR. Glóbulos Rojos.
- Hb. Hemoglobina.

HLA. Antígenos Leucocitario  $\approx$  Humanos.

Kb. Kilobases.

mA. Miliampers.

NS. No Significativo.

QO. Alelo Nulo.

rpm. revoluciones por minuto.

SPH. Sistema Principal de Histocompatibilidad.

SR. Síndrome de Reiter.

$\mu$ l. Microlitros.

V. Volts.

$\chi^2$ . ji-cuadrada.

## INDICE GENERAL

	Pags.
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCION.	4
III. GENERALIDADES.	7
III.1. Sistema Principal de Histocompatibilidad	8
III.2. Sistema del Complemento.	12
III.2.a. Deficiencias de Componentes del Complemento.	16
III.3. Polimorfismo del HLA.	18
III.4. Polimorfismo del Sistema del Complemento.	18
III.5. Polimorfismo del Segundo componente del Complemento.	21
III.6. Polimorfismo del Factor B.	21
III.7. Polimorfismo de C4.	23
III.8. Polimorfismo de la Glioxalasa I.	24
III.9. Nomenclatura de los alelos del Complemento	26
III.10. HLA y la Enfermedad.	27
III.11. Espondiloartropatías.	29
III.12. Patogenia y Frecuencia de las EAP.	29
IV. OBJETIVOS.	32
V. MATERIAL Y METODOS.	34
V.1. Tipificación de HLA-A y HLA-B.	35
V.2. Tipificación de Complotipos.	37
V.2.a. Factor B de la vía Alterna.	37
V.2.b. C4	40
V.2.c. C2	43
V.3. Tipificación de la Glioxalasa I.	46
V.4. Analisis Estadístico.	48
VI. RESULTADOS.	51

VII. DISCUSION.	82
VIII. CONCLUSIONES.	91
IX. GLOSARIO.	94
X. BIBLIOGRAFIA.	98

INDICE DE TABLAS

TABLA	TITULO	
1	FUNCIONES DE LOS GENES QUE FORMAN EL SPH .	10
2	CARACTERISTICAS FISICOQUIMICAS DE LOS 19 COMPONENTES DEL COMPLEMENTO.	14
3	ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE LOS COMPONENTES DEL COMPLEMENTO.	15
4	ESTADOS DE DEFICIENCIA DE LOS COMPONENTES DEL COMPLEMENTO Y ENFERMEDADES ASOCIADAS.	17
5	ALELOS DE LOS DISTINTOS LOCUS QUE FORMAN EL SISTEMA HLA.	19
6	POLIMORFISMO DE LOS GENES QUE CODIFICAN PARA LAS MOLECULAS DEL COMPLEMENTO.	20
7	ASOCIACIONES DEL HLA Y ENFERMEDADES.	28
8	COMPLOTIPOS Y GLO TIPIFICADOS EN LOS 55 PACIENTES CON EA .	53
9	COMPLOTIPOS Y ALELOS DE LA GLO TIPIFICADOS EN LOS 50 PACIENTES CON SR.	54
10	FRECUENCIAS DE LOS ALELOS DEL COMPLEMENTO EN LOS PACIENTES CON EA, SR Y CONTROLES NORMALES.	55
11	FRECUENCIAS DE LOS COMPLOTIPOS EN LOS CROMOSOMAS DE PACIENTES CON EA, SR Y CONTROLES NORMALES.	56
12	FRECUENCIA DE LOS COMPLOTIPOS MAS COMUNES DIVIDIDOS POR ALELOS DE LA GLO EN EA, SR Y CONTROLES NORMALES.	57
13	SIGNIFICANCIA ESTADISTICA DE ASOCIACION CON LA ENFERMEDAD DE LOS COMPLOTIPOS SOLOS O COMBINADOS CON LOS ALELOS DE LA GLO EN LOS GRUPOS DE PACIENTES ESTUDIADOS.	59

14	FRECUENCIA DE LOS FENOTIPOS EN LOS PACIENTES CON EA Y SR.	61
15	HAPLOTIPOS TIPIFICADOS DE LOS 10 SUJETOS CON EA	64
16	HAPLOTIPOS TIPIFICADOS DE LOS 19 SUJETOS CON SR.	65
17	COMPLOTIPOS Y GLO EN 31 CROMOSOMAS DE INDIVIDUOS SANOS B27 POSITIVOS.	67

### INDICE DE FIGURAS

FIGURA	TITULO	
1	REPRESENTACION ESQUEMATICA DEL SPH EN EL HUMANO.	11
2	POLIMORFISMO DEL SEGUNDO COMPONENTE DEL COMPLEMENTO.	22
3	POLIMORFISMO DEL FACTOR B.	23
4	POLIMORFISMO DE C4.	25
5	POLIMORFISMO DE LA GELIOXALASA I.	26
6	COMPLOTIPOS SIGNIFICATIVOS EN EA, SR Y NORMALES.	62
7	FRECUENCIA DE LOS FENOTIPOS (COMPLOTIPOS + GLO) EN LOS PACIENTES CON EA Y SR.	63
8	ARBOL GENEALOGICO DE LA FAMILIA # 1.	71
9	" " " " # 2.	72
10	" " " " # 3.	73
11	" " " " # 4.	74
12	" " " " # 5.	75
13	" " " " # 6.	76
14	" " " " # 7.	77
15	" " " " # 8.	78
16	" " " " # 9.	79
17	" " " " # 10.	80
18	" " " " # 11.	81

## I. R E S U M E N

Las EAP son un grupo de enfermedades de carácter multifactorial en las que intervienen factores genéticos y ambientales, los cuales interactúan para producir la alteración.

Entre los factores genéticos destaca la asociación del HLA-B27 del SPH -- con estas enfermedades, especialmente con el SR y la EA, mientras que dentro de los factores ambientales se cuentan a las infecciones bacterianas.

Debido a que no todos los sujetos que nacen con el marcador B27 desarrollan finalmente la enfermedad, se piensa que la predisposición puede ser dada por más de un gen y que éstos podrían localizarse también en el SPH.

Este estudio, realizado en 55 pacientes con EA y 50 con SR pretende determinar si otros genes del SPH participan en la susceptibilidad a las EAP. Los genes estudiados fueron los complotipos (fB, C2 y C4), el gen de la GLO 1 y los del sistema HLA-A y HLA-B.

Los antígenos del sistema HLA fueron determinados por la técnica de micro linfocitotoxicidad utilizando un panel de antisueros. El fB y C4 se estudiaron mediante electroforesis de alto voltaje en gel de agarosa, e inmunofijación -- con antisueros específicos; mediante electroenfoque y un ensayo hemolítico funcional con suero deficiente en C2 se determinó el segundo componente del complemento; finalmente, mediante electroforesis en acetato de celulosa se tipificó la glioxalasa I.

Entre los resultados que destacan, está el aumento de los complotipos SC30 y SC31, así como la disminución del SC42 en los pacientes con EA, mientras que en los pacientes con SR destaca el aumento del alelo 1 de la GLO. Se encontró también asociación de la EA con las combinaciones SC31 GLO\*2 y SC01 GLO\*1.

Se pudo establecer, además, una diferencia entre el SR y la EA en cuanto a la combinación del complotipo SC31 con los alelos de la GLO, encontrándose combinado con la GLO\*2 en EA y con la GLO\*1 en el SR.

Con respecto al análisis del HLA-A y HLA-B se corrobora el incremento

del HLA-B27 y la participación en sujetos HLA-B27 negativos de los complementos SC30, FC30 y FC31 en EA y del SC42 así como el SC32 en SR.

En conclusión, el presente trabajo nos permite establecer la existencia de nuevos marcadores asociados con las EAP, además del HLA-B27 ya reportado. - El estudio de estos marcadores a nivel de familias abre la posibilidad de tener una mayor vigilancia médica en sujetos que presenten algún marcador de susceptibilidad y además estén emparentados con algún enfermo con el cual compartan dicho marcador, permitiendo a su vez el rápido tratamiento del individuo evitando secuelas difíciles de revertir.

## II. INTRODUCCION

Las espondiloartropatías (EAP) son un grupo de enfermedades - entre las que se encuentran la Espondilitis Anquilosante (EA) y - el Síndrome de Reiter (SR), éstas se caracterizan porque afectan en gran medida a las articulaciones que sostienen el peso del --- cuerpo (rodillas, cadera, etc.) y sobre todo la columna vertebral. Desde el punto de vista de laboratorio tanto el factor reumatoide como los anticuerpos antinucleares (AAN) son persistentemente negativos en estos pacientes (14).

Por otro lado, estas enfermedades son de carácter multifactorial, es decir, participan en su etiología tanto factores genéticos como ambientales, los cuales interactúan para producir la alteración (7).

Con el objeto de estudiar la influencia de los factores genéticos, se han realizado estudios con los antígenos del Sistema -- Principal de Histocompatibilidad (SPH) ya que es el sistema genético más polimórfico del ser humano (7). Este sistema está formado por un grupo de genes estrechamente ligados en el brazo corto del cromosoma 6 humano y tienen la característica ya mencionada - de ser altamente polimórficos, heredándose en forma codominante y por bloque dada su cercanía (10).

Los genes que incluye este sistema han sido clasificados en tres grupos en base a la proteína que codifican (89). Los genes clase I están formados por los loci HLA-A, B y C; los genes clase II están formados por los loci HLA-DR, DP y DQ, y finalmente los genes clase III que codifican para tres proteínas del sistema del complemento (factor B, C2 y C4) y que se localizan entre el locus HLA-DR y el locus HLA-B (54). Cerca del centrómero y a 5 centimorgans (cM) de los genes clase II se encuentra un gen que codifica para la enzima eritrocitaria glioxalasa I (GLO I) y que está en desequilibrio de unión con los genes que componen el SPH (10).

El aspecto genético de estas enfermedades se basa en el hallazgo de que el 90 % de los pacientes con EA poseen el antígeno HLA-B27 (alelo del locus HLA-B) en la superficie de sus células (70), mientras que dentro de los factores ambientales participan bacterias específicas como Klebsiella, Salmonella, Shigella y Campylobacter, esto último como factor desencadenante de la enfermedad (20, 21, 39 y 87).

En este estudio, se trata el aspecto genético de las EAP en pacientes mestizos mexicanos, pensando que este aspecto puede ser dado por más de un gen, ya que, aunque la mayoría de los pacientes con EA presentan el HLA-B27, sólo muy pocos de los individuos que nacieron con este antígeno llegan finalmente a desarrollar la enfermedad (91) sugiriendo, por lo tanto, que además de este marcador, la predisposición a la enfermedad requiere de otros genes que podrían estar también comprendidos en el SPH (11, 92).

De los genes candidatos a interactuar con el HLA-B27 están los que se encuentran muy cercanos a él en el mismo cromosoma formando también parte del SPH. El HLA-B27 pertenece a los genes -- clase I siendo los más polimórficos, el locus que le sigue en polimorfismo es el de los genes clase III llamados también complotipos (5), encontrándose además muy cerca del locus HLA-B de los genes clase I.

Este trabajo estudia el polimorfismo de los genes clase III y del gen estructural de la glioxalasa I en las EAP tratando de encontrar una relación entre todos ellos y la enfermedad.

### III. GENERALIDADES

### III.1 SISTEMA PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD (SPH).

El Sistema Principal de Histocompatibilidad está formado por un grupo de genes localizados en el brazo corto del cromosoma 6 humano (10, 76 y 80); estos genes han sido clasificados en tres grupos en base a la proteína que codifican.

Los genes clase I, están constituidos por los loci HLA-A, B y C que codifican para una proteína que se encuentra en la superficie de todas las células nucleadas (47, 80) y, que se ha relacionado con el reconocimiento de células infectadas por virus, -- activación de células T y rechazo a injertos (94), esta proteína está formada por dos cadenas polipeptídicas unidas no covalentemente y de peso aproximado de 43,000 y 12,000 daltons (d) (16, 74, 84). La cadena ligera es una  $\beta$ -2-microglobulina no polimórfica -- (85) y que es codificada por un gen localizado en el cromosoma 15 (29); la cadena pesada es un polipéptido glicosilado que es codificado por los alelos HLA-A, B y C que se encuentran en el brazo corto del cromosoma 6 humano y que es la que da el elevado polimorfismo a estas moléculas clase I.

Los genes clase II, formados por los loci HLA-DR, DP y DQ, -- codifican por su parte antígenos de superficie que tienen una distribución muy restringida en cuanto al tipo de células que las expresan y se localizan únicamente en ciertas células tales como -- los linfocitos B (90), macrófagos (77), linfocitos T activados -- (19) y células endoteliales (78); estos antígenos se han relacionado con la cooperación celular (31) y están formados por dos cadenas polipeptídicas glicosiladas alfa y beta unidas no covalentemente y de peso aproximado de 33,000 y 28,000 d. respectivamente (12). El polimorfismo de estas moléculas reside en la cadena beta ya que se ha reportado que la cadena alfa no es polimórfica (73).

Por último, los genes clase III que es un grupo formado por

cuatro genes que codifican para dos proteínas de la vía clásica - del complemento (C2 y C4) y una de la vía alterna (factor B) (9), teniendo la característica de que el gen que codifica para C4 se encuentra por duplicado (C4A y C4B) (61), todos ellos ocupan una región de aproximadamente 120 Kilobases (Kb) del brazo corto del cromosoma 6 humano (60).

El C4 es una glicoproteína (26), cuya estructura fue caracterizada en 1963 como una  $\beta_1$ -globulina con un peso aproximado de -- 200,000 d. (56).. En 1974, Schreiber y Muller demostraron que C4 esta compuesto de 3 subunidades unidas por puentes disulfuro, la alfa, la beta y la gama de pesos de 98,000, 78.000 y 33,000 d. respectivamente (71).

El segundo componente del complemento (C2) ha sido uno de los componentes más difíciles de obtener ya que se presenta en el suero en una cantidad muy baja (20-25 mg/ml.) y es sumamente vulnerable a la proteólisis durante su obtención (40, 58). Esta proteína está formada por una única cadena de peso molecular aproximado de 100,000 d. que durante su activación se divide en dos cadenas no unidas por puentes disulfuro y de peso de 70,000 y 30,000 d.; la proteína activada puede ser una proteasa con el sitio catalítico en la cadena más pesada (53).

Muy cerca del centrómero y a 5 cM de los genes clase II se localiza el gen que codifica para la enzima eritrocitaria glicoxalasa I, la cual, es una enzima intracelular que cataliza la conversión de metilglicoxal y glutatión a S-lactoil-glutatión (42).

Debido a la cercanía de todos estos genes en el brazo corto del cromosoma 6 humano, se ha observado que las recombinaciones - entre cromosomas homólogos ocurren con una muy baja frecuencia, - heredándose todo el grupo de genes en bloque (10) (Figura 1).

El SPH juega un papel muy importante desde el punto de vista

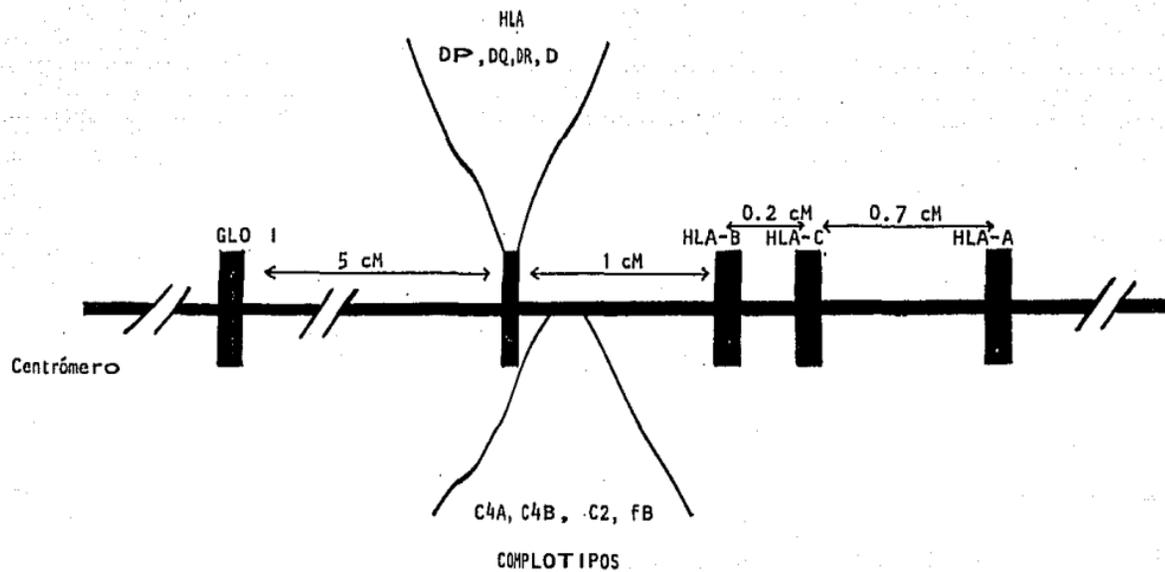
biológico debido a la cantidad y trascendencia de sus funciones en el organismo, algunas de estas funciones son mostradas en la tabla 1 (15, 31, 47, 76, 80 y 94).

**TABLA 1. FUNCIONES DE LOS GENES QUE FORMAN EL SPH  
(15, 31, 47, 80 y 94).**

---

- 1.- Regulación de la producción de anticuerpos humo-  
rales.
- 2.- Regulación de la producción de células T de --  
ayuda.
- 3.- Regulación de ciertas funciones de la respues-  
ta inmune.
- 4.- Regulación de la reacción de injerto contra --  
huésped.
- 5.- Biosíntesis de los componentes del complemento.
- 6.- La vigilancia inmunológica. Los antígenos co-  
dificados por esta región pueden servir como -  
sustrato para eliminación de patógenos.
- 7.- Marcadores para la identificación de genes in-  
volucrados en la patogénesis de varias enferme-  
dades, sobre todo de enfermedades autoinmunes.
- 8.- Regulación de la embriogénesis.
- 9.- Regulación de la síntesis y niveles de hormo-  
nas esteroides.

FIGURA 1. REPRESENTACION ESQUEMATICA DEL SPH EN EL HOMBRE .



### III.2 SISTEMA DEL COMPLEMENTO.

El sistema del complemento está formado por una serie de proteínas plasmáticas, que están presentes como precursores inactivos. Estos precursores se activan gracias a un conjunto de reacciones bioquímicas que involucran rupturas proteolíticas. (1).

Diecinueve componentes de este sistema han sido obtenidos y caracterizados y se muestran en la tabla 2, junto con su peso molecular, concentración en el suero y fragmentos en los que se rompen durante su activación (17).

Las proteínas del sistema del complemento juegan un papel muy importante en la generación de la respuesta inflamatoria normal y en las defensas del huésped contra una gran variedad de microorganismos (79). Esas actividades, son producidas por una secuencia de reacciones altamente complejas que involucran proteólisis limitada e interacciones específicas proteína-proteína (24).

La activación de los componentes del complemento promueve también la contracción del músculo liso, la quimiotaxis de neutrófilos, células mononucleares y eosinófilos, además de la inmunoadherencia de fagocitos. Otros efectos de la activación de este sistema incluyen: solubilización de complejos inmunes y neutralización de virus como se muestra en la tabla 3 (17, 43, 57).

La activación del complemento puede iniciarse mediante dos vías: la vía clásica ó la vía alterna, ambos sistemas de activación tienen en común la participación de un importante componente, la molécula C3.

Los componentes de la vía alterna y de la vía clásica participan en una cascada de reacciones proteolíticas que finalmente producen la lisis de la membrana celular. Se ha podido demostrar que las células que tienen una gran cantidad de ácido siálico no

son lisadas por la vía alterna debido a que hay un aumento de la afinidad de C3b por la proteína H que trae como consecuencia un bloqueo de la activación de esta vía. Lo anterior explica porque las bacterias que tienen ácido siálico en su cápsula presentan una actividad más patogénica que las que no lo presentan; por ejemplo: Streptococcus B del grupo III; Neisseria meningitidis -- grupos B y C; y E. coli KI (17).

Las homologías funcionales y estructurales entre los componentes de las dos vías de activación, sugiere que ellos pudieron haber evolucionado a través de un proceso de duplicación genética (22, 59, 63).

Aunque C3 y C4 no están genéticamente ligados en el humano, en el ratón C3 se localiza cerca del SPH, región en la cual se codifica la molécula de C4 (9, 61). Debido a que los péptidos de activación C3a y C5a tienen cerca de un tercio de homología en su estructura primaria, también se puede pensar que éstos se originaron de una duplicación genética (4, 22).

TABLA 2. CARACTERISTICAS FISICOQUIMICAS DE LOS 19 COMPONENTES DEL COMPLEMENTO (28).

Nombre	Peso Molecular	Concentración en suero mg/ml.	Fragmentos
<u>Vía Clásica</u>			
C1q	400,000	70	
C1r	95,000	35	
C1s	85,000	35	
C4	180,000	400	C4a, C4b, C4c, C4d
C2	117,000	25	C2a, C2b
<u>Vía Alternativa</u>			
C3	185,000	1500	C3a, C3b, C3c, C3d
B	95,000	250	
D	25,000	2	
P	220,000	25	
<u>Vía Efectora</u>			
<u>Común</u>			
C3	185,000	1500	
C5	200,000	85	C5a, C5b
C6	128,000	75	
C7	121,000	55	
C8	153,000	55	
C9	80,000	200	
<u>Proteínas de Control</u>			
Inhibidor de C1	105,000	180	
Proteína que une C4	1.2-1.5 x 10 <sup>6</sup>	250	
I (inactivador de C3b/C4b)	90,000	50	
H (beta 1H)	150,000	400	

**TABLA 3. ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE LOS COMPONENTES DEL COMPLEMENTO (1).**

Actividad	Componente
1.- Incremento de la fagocitosis (opsonización)	C3b
2.- Neutralización viral	C1 y C4b
3.- Iniciación de la lisis viral	C1q
4.- Aumento de la fagocitosis de levaduras	C5b
5.- Mediadores de la inflamación:	
a. Factor quimiotáctico	C3a, C5a, C5b67
b. Anafilotoxinas	C3a y C5a
c. Incremento de la permeabilidad vascular	Fragmento de C2
d. Liberación de leucocitos de médula ósea	C3b
6.- Lisis celular	C8 y C9
7.- Moduladores de la respuesta inmune	?C4b, ?C3b, ?C3d.

### III.2.a. Deficiencia de Componentes del Complemento.

Estudios a este respecto han revelado que deficiencias de componentes específicos del complemento pueden predisponer al desarrollo de ciertas enfermedades. En adición a las deficiencias heredadas, hay deficiencias adquiridas, las cuales, persisten por períodos largos y también pueden predisponer a enfermedades especialmente de tipo autoinmune (1).

En la tabla 4 se muestran las enfermedades asociadas a cada una de las deficiencias de los componentes del sistema del complemento, siendo desconocidas únicamente deficiencias para los factores B y D de la vía alterna así como para C9 (28, 44, 63).

Los pacientes deficientes en el componente terminal del complemento aparentemente son más susceptibles de ser atacados por agentes infecciosos, principalmente del tipo de los Gram negativos (28).

La existencia de individuos homocigotos deficientes de C3 -- con infecciones recurrentes, establece claramente el papel de C3 en el mantenimiento de las defensas normales del huésped (23). C3 puede no sólo ser crítico en la reacción bactericida sino también en el aumento de la fagocitosis a través de la presencia del receptor C3b en neutrófilos y monocitos (46).

El aparente incremento de la frecuencia de enfermedades tales como el Lupus Eritematoso Generalizado (LEG) y polimiositis en individuos con deficiencias del complemento está en contradicción con el supuesto papel del complemento como mediador de inflamación en estas enfermedades reumáticas (28), sin embargo, apoya el papel del complemento como participante en la eliminación de complejos inmunes, los cuales, en estas enfermedades se encuentran en cantidades elevadas.

TABLA 4. ESTADOS DE DEFICIENCIA DE LOS COMPONENTES DEL COMPLEMENTO Y ENFERMEDADES ASOCIADAS (28).

Componente	Enfermedad Asociada
C1q	Glomerulonefritis, Sépsis crónica
C1r	Síndrome semejante a Lupus, Glomerulonefritis, Lupus Discoide Crónico.
C1s	Lupus Eritematoso Generalizado.
C2	Lupus Eritematoso Generalizado, - Lupus Discoide Crónico Eritematoso, Dermatomiositis, Vasculitis, Enfermedad Inflamatoria Intestinal, Infecciones Bacterianas.
C4	Lupus Eritematoso Generalizado.
C3	Infecciones Bacterianas Recurrentes.
C5	Lupus Eritematoso Generalizado, - Infecciones Bacterianas Recurrentes.
C6	Infecciones Bacterianas Recurrentes principalmente por <u>Neisseria</u> .
C7	Fenómeno de Raynaud's con Esclerodactilia, Lupus Eritematoso Generalizado, Infecciones Bacterianas Recurrentes.
C8	Infecciones Bacterianas Recurrentes, Lupus Eritematoso Generalizado, Xeroderma Pigmentoso.
C9	Ninguna.
C1 INH	Angioedema Hereditario.
I	Infecciones Bacterianas Recurrentes.
P	Infecciones Bacterianas Recurrentes ( <u>Neisseria</u> ).

### III.3. POLIMORFISMO DEL HLA.

El elevado polimorfismo del sistema HLA se ha demostrado por el número de alelos de cada uno de los locus que lo integran, presentándose 23 alelos detectables en el locus A, 48 alelos en el locus B, 8 en el locus C, 16 en el DR, 19 en el locus D, 6 en el DP y 3 en el DQ.

Los alelos del HLA-A, B, C, DR, DP y DQ son detectados por pruebas de microlinfocitotoxicidad mediada por complemento (82). Los alelos del locus D son determinados por medio de una reacción en cultivo mixto de linfocitos (83).

Todos los alelos de cada uno de los locus que componen el sistema HLA se muestran en la tabla 5.

### III.4. POLIMORFISMO DEL SISTEMA DEL COMPLEMENTO.

Los loci del complemento ligados al HLA están constituidos por un locus para C2, uno para factor B y dos loci para C4 (C4A y C4B), todos mapeados entre los genes clase II y los clase I (54).

La fracción de recombinación entre los loci del complemento y el locus HLA-B ha sido estimada aproximadamente en 0.8 unidades de recombinación ó cM (88).

Los loci del complemento son los más polimorficos después del locus HLA-B y dicho polimorfismo es mostrado en la tabla 6 (5).

TABLA 5. ALELOS DE LOS DISTINTOS LOCUS QUE FORMAN EL SISTEMA HLA

HLA-A	HLA-B	HLA-C	HLA-D	HLA-DR	HLA-DQ	HLA-DP	
A1	B5	B49 (21)	Cw1	Dw1	DR1	DQw1	DPw1
A2	B7	Bw50 (21)	Cw2	Dw2	DR2	DQw2	DPw2
A3	B8	B51 (5)	Cw3	Dw3	DR3	DQw3	DPw3
A9	B12	Bw52 (5)	Cw4	Dw4	DR4		DPw4
A10	B13	Bw53	Cw5	Dw5	DR5		DPw5
A11	B14	Bw54 (22)	Cw6	Dw6	DR6		DPw6
Aw19	B15	Bw55 (22)	Cw7	Dw7	DR7		
A23 (9)	B16	Bw56 (22)	Cw8	Dw8	DRw8		
A24 (9)	B17	Bw57 (17)		Dw9	DRw9		
A25 (10)	B18	Bw58 (17)		Dw10	DRw10		
A26 (10)	B21	Bw59		Dw11	DRw11		
A28	B22	Bw60 (40)		Dw12	DRw12		
A29	B27	Bw61 (40)		Dw13	DRw13		
A30	B35	Bw62 (15)		Dw14	DRw14		
A31	B37	Bw63 (15)		Dw15			
A32	B38 (16)			Dw16	DR52		
Aw33	B39 (16)			Dw17	DR53		
Aw34	B40	Bw64		Dw18			
Aw36	B41	Bw65		Dw19			
Aw43	Bw42	Bw67					
Aw66	B44 (12)						
Aw68	B45 (12)						
Aw69	Bw46	Bw70					
	Bw47	Bw71					
	Bw48	Bw72					
		Bw4					
		Bw6					

TABLA 6. POLIMORFISMO DE LOS GENES QUE CODIFICAN PARA LAS MOLECULAS DEL COMPLEMENTO: FB, C2, C4A y C4B (5).

<u>FB</u>	<u>C2</u>	<u>C4A</u>	<u>C4B</u>
S	C	Q0*	Q0*
S1	B	1	1
F	Q0*	2	2
F1	A1	3	3
Otros**	Otros**	4	Otros**
		5	
		6	
		7	
		Otros**	

\* Alelos Nulos.

\*\* Alotipos con frecuencias menores a 0.01.

### III.5. POLIMORFISMO DEL SEGUNDO COMPONENTE DEL COMPLEMENTO (C2).

En 1976, fueron descubiertos 6 alotipos del segundo componente del complemento por Meo y col. quienes utilizaron la técnica de electroenfoque con una subsecuente lisis dependiente de complemento con un suero deficiente en C2 (52).

El alotipo más común es C2C con una frecuencia del 95 % en la población general, el que le sigue en frecuencia es una variante básica (C2B), la cual, tiene una frecuencia del 4 al 5 %; por último, existe una variante ácida que es sumamente rara y cuya frecuencia es menor al 1 % (C2A) (93), además, se ha observado un gen nulo ó silente (23, 62) con una frecuencia menor al 0.01 % -- (62, 64).

Los heterocigotos C2BC son observados en un 6 al 7 % de los sujetos. El homocigoto C2B tiene una frecuencia de 0.2 % en la población (18).

El C2 se hereda en forma autosómica dominante y su polimorfismo establecido por electroenfoque se muestra en la figura 2 (51).

### III.6. POLIMORFISMO DEL FACTOR B.

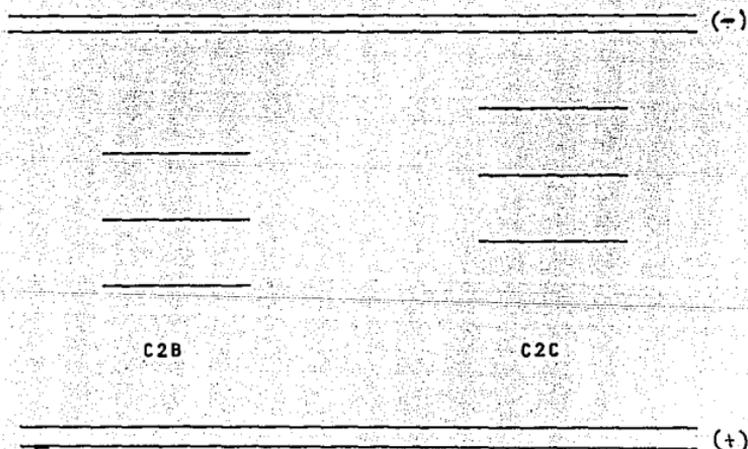
Para determinar la heterogeneidad genética de esta proteína de la vía alterna del complemento, se utiliza la técnica de electroforesis de alto voltaje en gel de agarosa e inmunofijación. - El primero en estudiar este polimorfismo fue Alper (2) quien obtuvo 4 bandas diferentes que fueron nombradas según su desplazamiento electroforético. A una de ellas se le llama FB\*F (por "fast" = rápido), a otra se le designó como FB\*S (por "slow" = lento); otra de las bandas fue llamada FB\*F1, esta banda se desplaza a una posición electroforética más hacia el ánodo que la variante FB\*F. - A la banda que se desplaza más lenta que la variante FB\*S se le -

denomina  $fB^*S1$ , la cual, se encuentra a una distancia más catódica que la banda S (3).

Las variantes más comunes son F y S, mientras que las variantes raras son F1 y S1. Estas 4 variantes del factor B que se obtienen por electroforesis son mostradas en la figura 3.

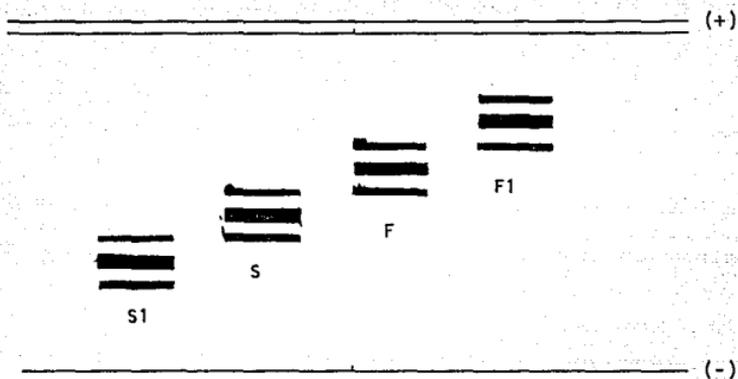
Esta proteína se hereda en forma autosómica dominante y no se ha descrito un gen nulo para ella, pero hay un alelo raro que da niveles normales de factor B pero tiene la característica de ser no funcional (50).

FIGURA 2. POLIMORFISMO DEL SEGUNDO COMPONENTE DEL SISTEMA DEL COMPLEMENTO (13, 51).



Únicamente se muestran las dos variantes más comunes de C2 (C2B y C2C) constituidas cada una por un patrón de tres bandas.

FIGURA 3. POLIMORFISMO DEL FACTOR B DEL SISTEMA DEL COMPLEMENTO (3, 13).



En esta figura se muestran las cuatro variantes del factor B obtenidas por electroforesis de alto voltaje. Cada variante presenta un patrón de tres bandas: una banda central gruesa y dos bandas más tenues localizadas en la parte superior e inferior de la banda gruesa.

### III.7. POLIMORFISMO DEL CUARTO COMPONENTE DEL COMPLEMENTO (C4).

De los componentes del complemento codificados en la región del SPH, éste es el que presenta el polimorfismo más elevado.

En 1969, Rosenfeld y col. (68) observaron los patrones polimórficos de C4 usando electroforesis prolongada en gel de agarosa con una electroforesis posterior en segunda dimensión; ellos notaron un modelo de herencia dominante posiblemente gobernada por dos loci estrechamente unidos.

El modelo de un único locus propuesto en 1975 por Rittner y col. (67) fue totalmente descartado cuando Olaisen y col. en 1979 (69).

usando estudios de absorción mostraron que el locus de C4 se encuentra por duplicado.

Por otro lado, Mauff y col. en 1978 (49) usando un sistema de buffer discontinuo e inmunofijación, establecieron la presencia de un patrón de 6 a 8 bandas para C4.

Otro importante paso en el estudio de esta proteína fue dado cuando Awdeh y Alper introdujeron el proceso de desialación con neuraminidasa antes de la electroforesis en gel de agarosa e inmunofijación (8). Aplicando este método pudieron distinguir 6 alelos del locus C4A y dos alelos de C4B así como la posible existencia de alelos nulos tanto para C4A como para C4B. Sorpresivamente estos alelos nulos se presentan con una frecuencia muy alta -- (13 - 19 % en la población general), pero los individuos totalmente deficientes de C4 ocurren de 1:1000 individuos (37).

Los productos comunes de C4A migran más anódicamente que los productos de C4B pero existen considerables diferencias en la zona de migración de las variantes raras de ambos loci.

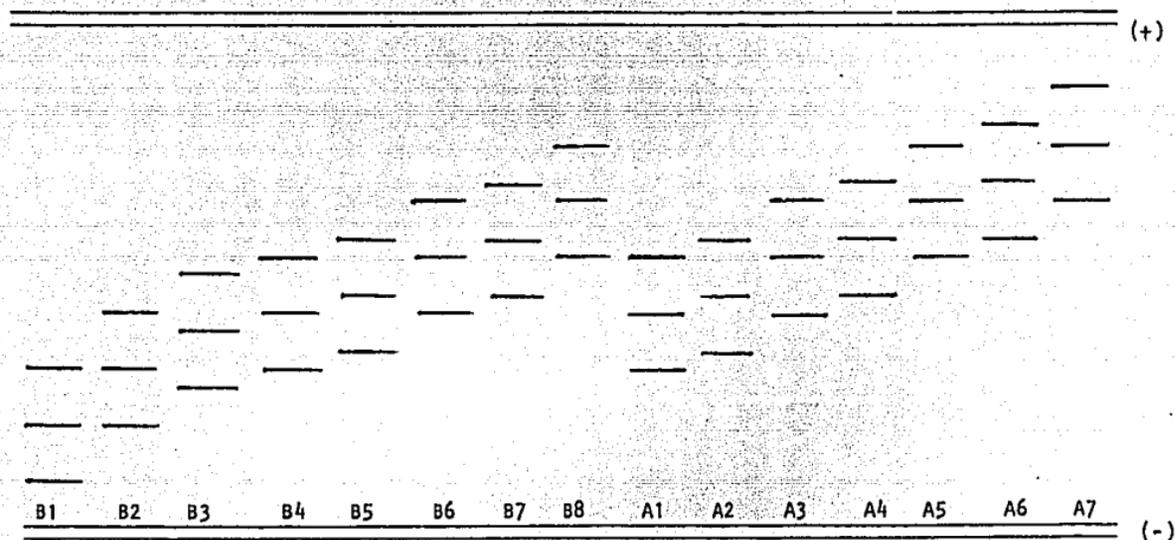
En la figura 4 se muestran las variantes electroforéticas de ambos loci de C4 que actualmente se conocen (5).

### III.8. POLIMORFISMO DE LA GIOXALASA I.

El gen que codifica para esta enzima eritrocitaria está localizado en el brazo corto del cromosoma 6 humano a 5 cM en dirección al centrómero de los genes clase II. Este gen tiene la característica de heredarse en forma codominante y estar en desequilibrio de unión con los genes que forman el SPH (10).

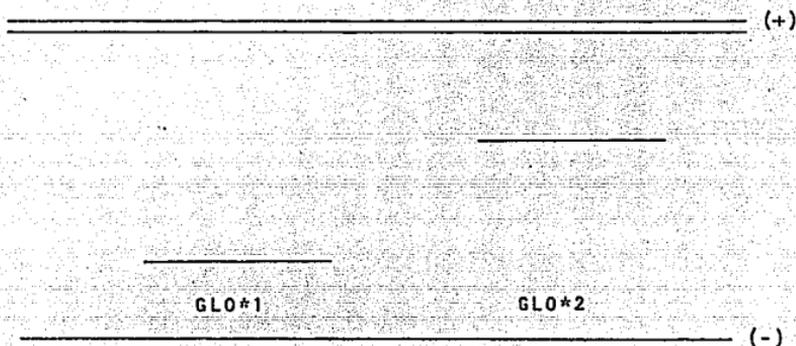
Este gen presenta dos variantes alélicas denominadas GLO\*1 y GLO\*2; su patrón electroforético se observa en la figura 5 (42).

FIGURA 4. POLIMORFISMO DEL CUARTO COMPONENTE DEL SISTEMA DEL COMPLEMENTO (5, 8).



En esta figura se muestran todas las variantes de C4 (C4A y C4B) obtenidas por --- electroforesis en gel de agarosa. Las variantes de C4A migran más anódicamente -- que las de C4B. Cada variante presenta un patrón de tres bandas.

FIGURA 5. POLIMORFISMO DE LA ENZIMA ERITROCITARIA GLO-XALASA I (GLO I) (42).



El patrón electroforético para las variantes de la enzima eritrocitaria GLO I está formado por una única banda para cada una de ellas

### III.9. NOMENCLATURA DE LOS ALELOS DEL COMPLEMENTO.

Un comité internacional ha estandarizado la nomenclatura de los alelos y haplotipos para los genes del complemento (73).

Los alelos individuales se designan con el nombre del locus, un asterisco y un número ó letra, ó el símbolo "Q0" si es un alelo nulo, por ejemplo C2\*Q0, C4B\*Q0, C4A\*2, C4B\*1. Los fenotipos de las proteínas se escriben con letras mayúsculas con un espacio entre el símbolo del locus y su variante, por ejemplo C4A 3, C4B 1.

Los haplotipos se escriben en la siguiente forma: se coloca primero el alelo de FB, luego el de C2, el de C4A y finalmente el de C4B, por ejemplo: FB\*S, C2\*C, C4A\*3, C4B\*1, sin embargo, en el texto prescindiremos de colocar el nombre del locus y únicamente se pondrá la letra ó número que indique la variante, para el ejemplo anterior quedaría como SC31.

### III.10. HLA Y LA ENFERMEDAD.

Las bases genéticas para cada una de las EAP ha sugerido su asociación con el sistema HLA. La ocurrencia de uno ó más de estos padecimientos en varios miembros de una misma familia ha sido ya reportado. Los modelos genéticos propuestos incluyen transmisión mendeliana dominante con penetrancia incompleta y herencia multigénica (7).

La importancia de factores ambientales fue también establecida debido a la discordancia de la presencia de EA en gemelos mono cigotos y el hallazgo de que el SR es disparado por ciertos agentes infecciosos específicos (20, 21, 39, 87). Recientes asociaciones de antígenos HLA, específicamente el B27 del locus B, corrobora todas estas hipótesis.

Las enfermedades asociadas al sistema HLA pueden ser agrupadas en tres categorías:

1). Enfermedades en las cuales el gen de susceptibilidad puede ubicarse fuera del SPH pero está ligado a un alelo particular del HLA, como ejemplos tenemos a la hemocromatosis y la hiperplasia adrenal congénita (15).

2). Enfermedades asociadas primariamente a los alelos de los loci D y DR. Este grupo incluye algunas enfermedades tales como la Artritis Reumatoide (AR) con asociaciones no establecidas con los locus A ó B y otros padecimientos como la enfermedad de Graves y la diabetes mellitus insulino-dependiente con una débil asociación con los alelos del locus B y una muy fuerte asociación con los del locus D (35, 65).

3). Enfermedades con una asociación primaria con los antígenos del locus B. En esta categoría se incluyen a las EAP tales como la EA y el SR.

De todas las enfermedades asociadas al sistema HLA probablemente la más fuerte es la que existe entre el HLA-B27 y la EA ya que un 90 % de los pacientes presentan este antígeno (70).

TABLA 7. ENFERMEDADES ASOCIADAS AL HLA.

ENFERMEDAD	HLA
Enfermedad de Hodkin	A1
Hemocromatosis Idiopática	A3
Enfermedad de Bahcet	B5
Hiperplasia Adrenal Congénita	B47
Espondilitis Anquilosante	B27
Síndrome de Reiter	B27
Uveítis Anterior Aguda	B27
Tioiditis Subaguda	B35
Psoriasis Vulgaris	Cw6
Dermatitis Herpetiforme	D/DR3
Enfermedad Celíaca	D/DR3
Síndrome de Sjögren	D/DR3
Enfermedad de Addison	D/DR3
Enfermedad de Graves	D/DR3
Diabetes Insulino-dependiente	D/DR3
Miastenia Gravis	D/DR3
	B8
Lupus Eritematoso Generalizado	D/DR3
Glomerulonefritis Extramembranosa	D/DR3
Neuritis Óptica	D/DR2
Esclerosis Múltiple	D/DR2
Deficiencia de C2	D/DR2
	B18
Síndrome de Goodpasture	D/DR2
Artritis Reumatoide	D/DR4
Tiroiditis de Hashimoto	D/DR5
Anemia Perniciosa	D/DR5
Artritis Reumatoide Juvenil	D/DRw8

### III.11. ESPONDILOARTROPATIAS.

Las espondiloartropatías (EAP) representan a un grupo de alteraciones caracterizadas por la presencia de inflamación periférica y artritis axial con participación sacroiliaca como común denominador y tendencia a la agregación familiar, así como, ausencia de nódulos subcutaneos y factor reumatoide.

Este grupo de enfermedades incluye la EA, el SR, la artropatía psoriática, la artritis reactiva, la artropatía crónica juvenil y otras.

La etiología de estos padecimientos no está aún bien definida pero se cree que en ella participan tanto factores genéticos - como ambientales, es decir, se ha considerado que son enfermedades de carácter multifactorial (14).

### III.12. PATOGENIA Y FRECUENCIA DE LAS EAP.

La fisiopatogenia de estos padecimientos no está aún bien definida, sin embargo, se han planteado posibles mecanismos que involucran en gran medida a los antígenos del sistema HLA.

Los posibles mecanismos patogénicos de estos padecimientos son en primer lugar, una reacción inflamatoria disparada por agentes exógenos en sujetos susceptibles genéticamente y en segundo lugar, una inflamación determinada por factores del huésped tales como el grado de producción de mediadores inflamatorios y sensibilidad del huésped a ellos (41).

La acción de los antígenos del sistema HLA en la patogenia - está posiblemente dada por su función como receptores para los organismos patogénicos ya sean virus, bacterias, etc., ó por la similitud desde el punto de vista estructural de estas moléculas -

con algunos antígenos de agentes infecciosos. Debido a esta imitación, el organismo huésped no puede reconocer a tales agentes - como no propios y es por esto que no es capaz de iniciar una respuesta inmunológica (75).

Recientemente, se ha postulado que la función de los neutrófilos está aumentada en los sujetos HLA-B27 positivos comparado con los negativos. Se piensa que este aumento de actividad está determinado genéticamente ó por otro lado, que un trastorno inflamatorio crónico produce una liberación de mediadores de la inflamación, los cuales, modiflan la función de los neutrófilos. En ambos eventos es razonable asumir que los neutrófilos hiperreactivos pueden disparar un círculo vicioso de inflamación y ello -- contribuya a lesionar el tejido en estos sujetos (66).

En cuanto a la frecuencia de estos padecimientos en mexicanos no se tienen datos reportados, sin embargo, datos del Departamento de Reumatología del INNSZ establecen una frecuencia del 2 % en estas enfermedades.

La más frecuente de las EAP en nuestro país es el SR, ya que de 10 sujetos con estas enfermedades, 6 presentan SR, 2 EA y los 3 restantes alguna de las otras EAP.

La relación hombre-mujer en estas enfermedades se encuentran para EA de 3:1 y para SR 1:2, mientras que para otras como artritis psoriática y uveítis la relación es similar.

En lo referente a la edad de inicio de las EAP se puede decir que los individuos son afectados en una edad reproductiva. -- La EA afecta a niños y adultos jóvenes (6 - 35 años), el SR se -- presenta en adultos jóvenes, la psoriasis es característica en un rango de edad de 25 a 30 años y la artritis psoriática se presenta en un rango de edad de 32 a 45 años.

Como se puede ver, las EAP tienen una gran importancia en -- nuestro país ya que en primer lugar, estas afectan a la población en edad reproductiva así como económicamente activa, produciendo alteraciones que muchas veces son irreversibles y llevan al pa-- ciente a depender totalmente de otras personas.

#### IV. OBJETIVOS

El presente estudio, realizado en sujetos que presentaron alguna espondiloartropatía (específicamente EA y SR) y sus familiares sanos ó afectados, trata de definir si existen otros marcadores del SPH además del HLA-B27 que predispongan a ciertos individuos a desarrollar la enfermedad.

El llegar a establecer la existencia de marcadores de susceptibilidad para estos padecimientos, podrá permitir la detección temprana de sujetos con alto riesgo de padecer la enfermedad y de sujetos que sin presentar datos clínicos puedan ya estar presentando alteraciones preclínicas, lo cual a su vez, traera como consecuencia un tratamiento oportuno y por tanto mayores posibilidades de recuperación para estos sujetos, ya que evitaría secuelas difíciles de revertir.

Los objetivos que persigue este estudio son por tanto los siguientes:

- 1.- Establecer la importancia del estudio de los genes que codifican para las proteínas del sistema del complemento (fB, C2 y C4), así como del gen que codifica para la enzima glioxalasa I en la etiología de las EAP.
- 2.- Definir si existe alguna asociación entre los haplotipos (complotipos más alelos de la GLO I) del SPH en las EAP en sujetos mestizos mexicanos.
- 3.- Llegar a identificar individuos que presenten algún haplotipo del SPH que les predisponga a las EAP.
- 4.- Establecer la relación entre HLA, los complotipos y los alelos de la GLO I en pacientes con EAP.
- 5.- Identificar si hay marcadores que puedan ayudar a diferenciar a la EA del SR debido a que son enfermedades muy parecidas desde el punto de vista clínico y ambas se han asociado con el antígeno HLA-B27.

## V. M A T E R I A L E S Y M E T O D O S

El presente estudio se realizó en 55 individuos que presentaban EA y 50 que presentaban SR (edades entre 20 y 70 años), todos ellos mestizos mexicanos no emparentados entre sí. A estos sujetos se les tipificaron las moléculas del complemento (fB, C2 y C4) que son codificadas por genes localizados en el SPH, además de la glicoxalasa cuyo gen estructural se encuentra cerca de este sistema.

Con el fin de establecer la relación entre el sistema HLA, los complotipos y la GLO I, se tipificaron los antígenos HLA-A y B en 10 sujetos con EA y 19 con SR, todos pertenecientes al grupo anterior.

Finalmente, se realizó el estudio de los genes del sistema HLA, complotipos y la GLO I en 11 familias de los sujetos ya anteriormente estudiados; con esto, se pretende realizar un estudio más fino sobre el desequilibrio genético entre estos genes.

El análisis estadístico utilizado para establecer las diferencias entre los grupos de estudio, se basó fundamentalmente en 2 pruebas: la prueba de  $\chi^2$  (ji-cuadrada) en tablas de contingencia de 2 x 2 y el método logístico empírico (34).

#### V.1. TIPIFICACION DE LOS ANTIGENOS HLA-A y HLA-B (82).

Las diferentes variantes de estos locus se determinan por la técnica de microlinfocitotoxicidad utilizando un panel de antisuecos que detectan más de 100 especificidades. Estos marcadores son tipificados en células mononucleares totales.

##### A. Equipo:

- 1.- Centrífuga CO-500 Damon/JEC Division.
- 2.- Microscopio de luz (Zeiss).
- 3.- Cámara de Neubauer.
- 4.- Microscopio de contraste de fases (Zeiss).

**B. Material:**

- 1.- Placas de Histocompatibilidad Nunc.
- 2.- Jeringa Hamilton de disparo constante (1  $\mu$ l).
- 3.- Jeringa múltiple Hamilton de disparo constante (5  $\mu$ l).
- 4.- Jeringa múltiple Hamilton de disparo constante (1  $\mu$ l).
- 5.- Pipetas graduadas de 5 - 10 ml.
- 6.- Tubos Falcon de 50 ml.
- 7.- Perilla de succión.
- 8.- Micropipeta de 10  $\mu$ l.

**C. Reactivos:**

- 1.- Solución amortiguadora de fosfatos pH= 7.4.
- 2.- Solución de ficoll-Hypaque con densidad de 1.077.
- 3.- Formalina al 40%.
- 4.- Eosina al 5%.

**D. Material Biológico:**

- 1.- 20 ml. de sangre obtenido con heparina como anticoagulante
- 2.- Antisueros a granel.
- 3.- Complemento de conejo (Pel-Freez).

**E. Técnica:****1.- Obtención de células:**

- Las células mononucleares son obtenidas de 20 ml. de sangre heparinizada por centrifugación en un gradiente de ficoll-hypaque.
- Después de la centrifugación, las células son extraídas de la interfase y resuspendidas en PBS (amortiguador de fosfatos).
- Las células resuspendidas son centrifugadas durante 15 min. a 1500 rpm. (primer lavado).
- El paquete nuevamente es resuspendido en PBS Y se centrifuga por 10 min. a 1200 rpm. (segundo lavado).
- Finalmente, se realiza otro lavado en condiciones semejantes al anterior (tercer lavado).

- Después del último lavado, el paquete celular es resuspendido y llevado a una concentración final de  $5 \times 10^6$  céls./ml.
- 2.- Montaje de la técnica de microlinfocitotoxicidad:
  - Las placas de tipificación (72 pozos) son montadas utilizando 72 antisueros (1  $\mu$ l. por pozo) y aceite mineral para evitar la evaporación de éstos.
  - En cada pozo de la placa de tipificación se coloca 1  $\mu$ l. de la suspensión de células previamente ajustadas a  $5 \times 10^6$  céls./ml.
  - Se incuba la placa a temperatura ambiente durante 30 min.
  - Se colocan 5  $\mu$ l. de complemento de conejo a cada pozo y se incuba a temperatura ambiente durante 60 min.
  - Se agregan 2  $\mu$ l. de Eosina al 5% a cada pozo y se incuba 3 min.
  - Finalmente, se agregan 5  $\mu$ l. de Formalina al 40% para detener la reacción y la placa es leída en un microscopio de fase invertida.

## V.2. TIPIFICACION DE COMLOTIPOS.

### V.2.a. Factor B de la vía Alternativa del Complemento (3, 13).

Los polimorfismos de los factores B y C4 se determinan mediante las técnicas de inmunofijación y electroforesis en gel de agarosa. La electroforesis es de alto voltaje y una vez finalizada, las bandas de las proteínas en cuestión se fijan mediante anticuerpos específicos.

#### A. Equipo:

- 1.- Cámara Deluxe para electroforesis Gelman Science.
- 2.- Fuente de poder Deluxe Gelman Science.
- 3.- Bomba de agua circulante Thomas Scientific.
- 4.- Centrífuga CO-500 Damon/JEC Division.
- 5.- Balanza analítica Sartorius.
- 6.- Agitador magnético con platina de calentamiento.

## B. Material:

- 1.- Rectángulo de película de plástico de 10 x 20 cms. (Gel-Bond Film Marine Calloids, Maine USA).
- 2.- Placas de vidrio de 10 x 20 cms.
- 3.- Marcos de plástico en forma de "U" de 1 mm. de espesor.
- 4.- Papel filtro tipo Whatman de 11.
- 5.- Aplicador de muestras.
- 6.- Micropipetas de 15 y 25  $\mu$ l.
- 7.- Sujetadores.

## C. Reactivos:

- 1.- Amortiguador de barbitol y lactato de calcio pH 8.6 0.05M.
- 2.- Agarosa Sea-Kem Marine Calloids Maine USA. (se prepara al 1% en amortiguador de barbitol).
- 3.- Solución salina al 0.85%.
- 4.- Glicerol.
- 5.- Solución de Azul de Coomassie a 1 2.5% (en una solución de 45% de metanol, 10% de ácido acético en agua).
- 6.- Metanol al 50% en agua destilada más la quinta parte del volumen total de ácido acético (Solución decolorante).

## D. Material biológico:

- 1.- Plasma EDTA obtenido de 5 ml. de sangre.
- 2.- Una alícuota de Hemoglobina humana.
- 3.- Anticuerpo anti-factor B B. Atlantic Antibodies, Scarborough, Mo USA.

## E. Técnica:

- 1.- Preparación del gel.

Cubrir la placa de vidrio mediante una brocha con una capa fina de glicerol, inmediatamente colocar la película de plástico y presionar para sacar las burbujas de aire. Posteriormente colocar el marco de plástico en forma de "U" el cual se fija a la placa mediante los sujetadores, una vez lista la cámara vaciar la solución de agarosa caliente y se deja

solidificar. Ya que solidificó el gel, se quitan los sujetadores y el marco de plástico, secar con papel filtro la zona donde se aplicarán las muestras.

## 2.- Aplicación de las muestras.

- Con papel filtro Whatman # 1 se seca aproximadamente 3 cms. del final del gel (a través de todo el gel) donde se aplican las muestras (cátodo). Repetir el proceso 2 veces.
- Sobre el área seca se coloca un aplicador plástico que -- tiene perforaciones rectangulares para aplicar las muestras (MASK). En la primera perforación se colocan aproximadamente 10  $\mu$ l. de Hb A que sirve como indicador y en las demás perforaciones se coloca el mismo volumen de cada -- muestra.
- Se espera hasta que las muestras se hayan absorbido las -- muestras en el gel (aprox. 15 min.). Se quita el exceso de muestra que no penetra con papel Whatman #1 y se retira el aplicador de plástico MASK.

## 3.- Corrimiento de la muestra.

- Las placas se colocan sobre bases enfriadas por agua circulante entre 6 y 10  $^{\circ}$ C para evitar el sobrecalentamiento -- del gel de agarosa.
- El contacto entre el gel y el amortiguador (electrodo) -- (sol. 1), se realiza mediante una mecha constituida por 5 hojas de papel filtro Whatman # 1 (del mismo ancho que la placa del gel) perfectamente humedecida en el amortiguador electrodo (sol. 1). Una de las puntas de la mecha se coloca exactamente atrás de las muestras y la otra a 1 cm. del final del gel.
- La superficie del gel se cubre con un plástico o vidrio -- para prevenir desecamiento y la electroforesis se lleva a cabo a 350 Volts (75 mA) hasta que la Hb haya migrado hasta casi la segunda mecha (3 horas aproximadamente).

## 4.- Inmunoprecipitación.

- En las condiciones electroforéticas anteriores, las bandas

del factor  $\beta$  emigran en una zona de 3 a 6.5 cms. del origen. En esta zona se aplica el anticuerpo específico anti  $\beta$  humano.

- Se incuba el gel durante 1 hora a temperatura ambiente en una cámara húmeda horizontal.
- Se enjuaga posteriormente el gel con agua destilada y se cubre la superficie con papel Whatman, el cual ha sido húmedo con agua destilada. Esto se cubre ahora con aproximadamente 12 hojas de papel secante tipo toalla. Se coloca encima una placa de plástico y un peso de 4 Kg.
- Se remueve después de 10 min. y se quita el peso y el papel. Posteriormente el gel se enjuaga durante toda la noche aproximadamente en un litro de solución salina para remover restos de proteínas inespecíficas.
- En seguida, el gel se lava en agua destilada durante 20 min.. Posteriormente se seca al aire ya sea a temperatura ambiente ó aplicando calor.
- Se tiñe la placa durante 10 min. con solución de Azul de Coomassie (sol. 5).
- Se enjuaga la placa con la solución desteñidora hasta obtener el mejor contraste (sol. 6).
- Se deja evaporar el exceso de metanol a temperatura ambiente.
- Se lee la placa.

Las variantes electroforéticas obtenidas se muestran en la figura 3.

#### V.2.b. Cuarto Componente del Sistema del Complemento (S, 3).

El cuarto componente del sistema del complemento (C4) es controlado por dos loci localizados muy cerca uno del otro entre los loci HLA-B y HLA-D/DR sobre el cromosoma 6 humano. El elevado polimorfismo de este componente es revelado por electroforesis de -

alto voltaje seguida de inmunoprecipitación y tinción de muestras de plasma con EDTA, previamente tratadas con neuraminidasa para eliminar el ácido siálico.

**A. Equipo:**

El mismo que se usa para factor B.

**B. Material:**

- 1.- Fibra de vidrio de Corning Glass Works, N. Y.
- 2.- Placa de vidrio de 13 x 20 cms.
- 3.- Papel celofán secado a temperatura ambiente durante 6 meses ó más.
- 4.- Todo el material restante es el mismo que para determinar el factor B.

**C. Reactivos:**

- 1.- Amortiguador de fosfatos pH 6.8 y 5 mM de Na<sub>2</sub>EDTA para diálisis.
- 2.- Amortiguador de corrimiento: Tris-Glicina/Barbital pH 8.8.
- 3.- Agarosa de electroendosmosis mediana de INC. PHARMACEUTICAL CO. USA.
- 4.- Solución de agarosa al 0.75% y de amortiguador de corrimiento y 5 ml. de EDTA al 0.2 M y agua destilada para completar 100 ml.
- 5.- Solución salina al 0.85%.
- 6.- Solución de Azul de Coomassie (la misma usada para FB).
- 7.- Solución decolorante (la misma para FB).

**D. Material biológico:**

- 1.- Plasma EDTA obtenido de 5 ml. de sangre.
- 2.- Hemoglobina A como marcador.
- 3.- Anticuerpo anti-C4 humano, Atlantic Antibodies, Scarborough, Mo. USA.
- 4.- Neuraminidasa tipo VI obtenida de Clostridium perfringens. Sigma Chemicals Co. St. Louis USA.

## E. Técnica:

## 1.- Desialación.

- 10  $\mu$ l. de la muestra se mezclan con 2  $\mu$ l. de neuraminidasa y se colocan en un sistema de diálisis continuo durante 18 horas a 4 °C.

## 2.- Preparación del gel de corrimiento.

- Se cubre una placa de vidrio con una solución de agarosa - al 0.5% en agua destilada. Se deja secar.
- Se forma un molde colocando encima de la placa anterior una segunda placa de plástico siliconizada y entre ellas el marco de 1 mm. de espesor. Se mantienen juntas las placas mediante los sujetadores metálicos.
- Se vierte la solución de agarosa de corrimiento para-C4 - (sol. 3), aún caliente, dentro del molde y se deja solidificar. Se sella perfectamente el molde con envoltura de plástico y se almacena en refrigeración hasta su uso.

## 3.- Colocación de las muestras.

- Se reduce el exceso de agua del gel de corrimiento, colocando 2 veces sobre él una tira de 5 cms. de ancho de papel filtro.
- Sobre la parte donde se ha quitado el exceso de agua, se coloca el aplicador plástico para muestras (MASK), de tal forma que las muestras queden a unos 2 cms. del extremo final del gel.
- Se colocan de 7 a 10  $\mu$ l. de muestras dializadas en cada ranura del aplicador.
- Se coloca una muestra de Hb al principio del gel, como marcador visual.
- Una vez que las muestras se han absorbido en el gel, se retira el aplicador.

## 4.- Corrimiento electroforético.

- Se coloca la placa con el gel en el equipo de electroforesis, con las muestras en el lado del cátodo.
- Se moja en conjunto 5 hojas de papel Whatman (del tamaño -

de la placa del gel) en el amortiguador de corrimiento -- (sol. 2) y se colocan en ambos extremos (ánodo y cátodo) de la placa de gel (2 cms. antes del final).

- Se cubre la placa para evitar desecamiento del gel y se ajusta la fuente de poder a una corriente constante de 65 mA (300 - 500 V.) y se deja el corrimiento hasta que el marcador de Hb ha alcanzado el extremo opuesto (4 - 5 hrs.).

#### 5.- Inmunoprecipitación y tinción.

- Se distribuye 1 ml. de anticuerpo anti-C4 humano en una área de 5 cms. en el centro del gel.
- Se incuba durante una hora en una cámara húmeda.
- Se enjuaga cuidadosamente el gel bajo un chorro de agua corriente.
- Se cubre el gel con una hoja de papel Whatman, humedecido con agua destilada, seguido de 10 hojas de papel absorbente tipo toalla y una placa de vidrio. Se coloca encima un peso de 4 Kgs.. Se mantiene así durante 10 min.
- Se enjuaga el gel en solución salina durante toda la noche.
- Se lava el gel en agua corriente durante 20 min..
- Se seca y se tiñe con solución de Azul de Coomassie al 2.5%.
- Se destiñe hasta alcanzar un contraste óptimo (sol. 6 de FB).

Los patrones de bandas obtenidos se observan en la fig. 4.

#### V.2.c. Segundo Componente del Sistema del Complemento (13, 51).

El polimorfismo del segundo componente del complemento puede ser detectado después del electroenfoque de muestras de plasma ó suero en un gel de acrilamida seguido de la aplicación de un recubrimiento hemolítico funcional. La lisis por el complemento ocurre en el sitio que contiene eritrocitos de carnero sensibilizados y todos los componentes del complemento, excepto C2; esa será la posición de C2 en el gel de electroenfoque.

## A. Equipo:

- 1.- Equipo de electroenfoque. Multiphore LKB.
- 2.- Balanza analítica Sartorius.
- 3.- Centrífuga. CO-500 Damon JEC Devisson.
- 4.- Estufa. National Meincke Company.
- 5.- Agitador magnético.

## B. Material:

- 1.- Placas de vidrio de 10 x 20 cms. y de 2 mm. de espesor.
- 2.- Marcos de plásticos de 10 x 20 cms. y de 1 mm. de espesor.
- 3.- Marcos de plástico de 20.5 x 11 cms. y 1 mm. de espesor.
- 4.- Sujetadores.
- 5.- Micropipeta de 10  $\mu$ l.
- 6.- Pinzas.
- 7.- Termómetro.
- 8.- Papel filtro tipo Whatman # 1.

## C. Reactivos:

- |  |  |
|--|--|
| 1.- Acrilamida                                     | Eastmal Kodak Company Printed                |
| 2.- Anfolinas pH 5-8 y 3.5-10                      | LKD Sweden, USA.                             |
| 3.- Riboflavina (solución al 1% en agua destilada) | Bio-Rad. Laboratories, Richmond, Calif. USA. |

## D. Material biológico:

- 1.- Plasma EDTA proveniente de 5 ml. de sangre.
- 2.- Suero humano deficiente en C2.
- 3.- Eritrocitos de carnero sensibilizados (45).

## E. Técnica:

- 1.- Preparación del gel.

- Se coloca sobre un vidrio de 10 x 20 cms., un marco de plástico de 1 mm. de espesor y 0.5 cms. de ancho (el marco cubre 3 lados del vidrio. Encima de este último se coloca una placa de plástico siliconizada de las mismas dimensio-

nes del vidrio. Se mantienen las placas juntas con los sujetadores de tal forma que se obtiene una cámara de 1 mm. de espesor con un extremo abierto.

- En un matraz colocar 40 ml. de solución de acrilamida al 6 %, 10.8 ml. de riboflavina al 1%, 2 ml. de anfolina pH 5 - 8, 0.4 ml. de anfolina pH 3.5 - 10. Se mezclan y se degasifican.
  - El gel es vaciado en la cámara preparada anteriormente.
- 2.- Aplicación de las muestras.
- Para la aplicación de las muestras usar rectángulos de papel filtro de dimensiones de 0.5 x 2 cms., situándolos a 3 mm. de distancia uno del otro y colocados a 2.5 cms. de distancia del electrodo ánodo. La distancia entre cada tira de papel debe ser tal que permita colocar aproximadamente 20 tiras por gel.
  - Se aplican 20  $\mu$ l. de muestra sobre cada tira de papel.
- 3.- Corrimiento de las muestras.
- El aparato para electroenfoque se coloca en un cuarto frío a 4 °C.
  - Se coloca el electrodo positivo exactamente atrás de las muestras y el electrodo negativo aproximadamente 9 cms. adelante de éstas.
  - Se ajusta la fuente de poder a 1.5 Watts/gel, un voltaje máximo de 1000 y una corriente inicial de 6 mA/gel (media hora).
  - Se enfoca el gel durante 18 hrs., ó hasta que la corriente haya caído a 2 mA/gel.
- 4.- Preparación del gel para revelar C2.
- A un matraz agregar 14.5 ml. de agarosa al 0.6%, 10  $\mu$ l. de suero humano deficiente de C2. Se calienta la solución y cuando está a 70 °C, se agregan 14.5 ml. de eritrocitos de carnero sensibilizados.

### 5.- Ensayo hemolítico.

- Una vez que ha terminado de correr la muestra; colocar sobre la placa de electroenfoque un marco de plástico (20.6 x 11 cms.), y cortar el gel sobrante. A esta placa que tiene las muestras y el marco ponerle otra placa y colocar los sujetadores, vaciar el gel (para revelar G2) e incubar a 37 °C por espacio de 2 horas. Una vez finalizada la incubación se hace la lectura de la placa.

### 6.- Fijación de la placa.

- Si se quiere conservar la placa para hacer lectura posteriores, se fija la placa con una solución de glutaraldehído al 0.1% en PBS por 10 min.; para ello quitar el gel de poliacrilamida quedandose con el gel de agarosa e introducir la placa en la solución de glutaraldehído y dejar secar.

Los patrones de bandas obtenidos para este componente son -- mostrados en la figura 2.

## V.3. GLIOXALASA I (GLO I) (42).

La glioxalasa I es una enzima eritrocitaria que cataliza la conversión de metilglioxal y glutatión a S-lactoil-glutatión; el polimorfismo de esta enzima se puede observar por medio de electroforesis del lisado de glóbulos rojos (GR) y posterior tinción con metilglioxal más glutatión.

### A. Equipo:

- 1)- El mismo que se usa para determinar el polimorfismo de fB.

### B. Material:

- 1.- Hojas de acetato de celulosa. Chemetron. Milano, Italy. conservadas en 30% de etanol 4°C.
- 2.- Micropipeta de 10 µl.
- 3.- Tijeras.

## C. Reactivos:

- 1.- Amortiguador de corrimiento Tris/Barbital pH 8.3. 0.03M.
- 2.- Amortiguador para tinción No. 1.  
Amortiguador de fosfatos pH 6.5 0.1 M.
- 3.- Amortiguador para tinción No. 2. Tris/HLC. pH 7.8.
- 4.- Metilgloxal. Sigma Chemical Company St. Louis USA.
- 5.- Glutatión reducido " " " " " "
- 6.- Metiltetrazollo. " " " " " "
- 7.- Diclorofenol-indol. " " " " " "
- 8.- Mercaptoetanol. " " " " " "
- 9.- Tolueno.
- 10.- Solución salina 0.85%.

## D. Material biológico:

- 1.- Lisado de GR. proveniente de 5 ml. de sangre completa.

## E. Técnica:

- 1.- Obtención del lisado de GR.
  - Se toman 10 ml. de sangre venosa con EDTA .
  - Se centrifuga a 2000 rpm. durante 10 min. y se separa el plasma para la tipificación de fB, C2 y C4.
  - Se lava el paquete de GR. 3 veces con solución salina.
  - Se adiciona agua destilada y tolueno en una cantidad equivalente a la mitad y a la cuarta parte del volumen de GR. respectivamente. Se agita en un vortex durante 30 seg.
  - Se centrifuga 10 min. a 2000 rpm..
  - Se obtiene el lisado de GR. ayudándose con una pipeta pasteur. El lisado se puede almacenar a - 70 °C .
- 2.- Aplicación de las muestras.
  - Se enjuaga con agua destilada durante 10 min. la hoja de acetato de celulosa.
  - Se saca del agua y se seca con hojas de papel secante.
  - Se enjuaga nuevamente la hoja durante 5 min. en 500 ml. de solución amortiguadora de corrimiento (sol. 1).
  - Se seca nuevamente y se coloca en el equipo de electrofore

sis y se conecta la fuente durante 10 min. a 300 V y 10 mA. Los compartimientos de la cámara deben llenarse con 500 ml. de buffer de corrimiento (sol. 1).

- Se aplican 3  $\mu$ l. del lisado de GR. en la hoja de acetato de celulosa con una separación de 0.5 cms. entre cada muestra, de tal forma que las muestras queden en el extremo catódico.

### 3.- Electroforesis.

- Se corren las muestras a 300 V. durante 2 horas a temperatura ambiente. La electroforesis se completa cuando la Hb ha migrado aproximadamente 3 cms. del origen.
- Se corta la hoja de acetato de celulosa a nivel del puenanódico y en el extremo catódico exactamente atrás de la Hb.

### 4.- Tinción.

- Se tiñe la hoja de acetato de acetato de celulosa sobre una placa de vidrio, colocando la porción absorbente hacia abajo sobre la tinción No. 1, durante 2 min. (sol. 2).
- Se transfiere la hoja a la tinción No. 2 y se mantiene en ella durante 2 min. (sol. 3).
- Se coloca la hoja en una cámara húmeda con el lado teñido hacia arriba. Se mantiene la cámara húmeda en la oscuridad y se lee después de 30 min.

Los patrones de bandas obtenidos se observan en la fig. 5.

## V.4. ANALISIS ESTADISTICO.

### 1. Prueba de $\chi^2$ (ji-cuadrada).

La comparación entre dos grupos de estudio en función de dos características independientes, se efectúa generalmente mediante tablas de contingencia de 2 x 2 (81).

	Grupo A	Grupo B	
Característica	a	b	a + b
+			
-	c	d	c + d
	a + c	b + d	N = a+b+c+d

Para poder establecer la probabilidad de que ambos grupos difieran uno del otro en forma significativa, y que su variación no haya sido sólo debida al azar, la tabla de 2 x 2 se evalúa mediante la prueba estadística  $\chi^2$  ( 48, 81 ).

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

Si el valor obtenido de la prueba  $\chi^2$  implica un valor de "p" menor a 0.05, la hipótesis nula que dio origen a la comparación se rechaza. Un valor de "p" menor a 0.05 significa que en menos de 1 en 20 casos se comete error al rechazar la hipótesis nula.

El valor "p" se obtiene al interpolar en tablas de distribución ji-cuadrada el valor numérico de  $\chi^2$  en función de los grados de libertad de la prueba. Para todas las tablas de contingencia de 2 x 2 se considera un grado de libertad. Si a, b, c ó d fueran menores a 5, la prueba de ji-cuadrada deja de tener validez y se debe utilizar en este caso la prueba exacta de Fisher que nos da directamente el valor de "p".

$$f = \frac{(a + b)! (c + d)! (a + c)! (b + d)!}{a! b! c! d! N!}$$

## 2. Método Logístico Empírico (34).

Este método estadístico aceptado de análisis de tablas de contingencia de  $2 \times 2$  que permite discriminar entre asociaciones primarias y secundarias de dos fenotipos diferentes con una enfermedad. Si ambos antígenos resultan estar positivamente asociados con la enfermedad, pudiera ser que cada uno esté asociado con ella en forma independiente, ó que uno se encuentre asociado sólo debido a su combinación con el otro antígeno. Una prueba de  $\chi^2$  no se fía suficiente para resolver esta situación.

La transformación logística de proporciones como también se le denomina, es mucho más cercana a la distribución normal y proporciona estimaciones varianza confiables.

El modelo biológico considerado en el método logístico empírico es un sistema de dos loci, uno es el loci de las moléculas del complemento y el otro el de la GLO I. Si consideramos a los complotipos como A y a la GLO I como B, habrá cuatro posibles combinaciones fenotípicas: A+ B+, A+ B-, A- B+ y A- B-, y para cada combinación habrá "r" sujetos con la enfermedad y "n - r" sujetos sanos. Las correspondientes transformaciones logísticas empíricas de la proporción  $r/n$  están definidas por:

$$Z = \ln \left( \frac{r + 1/2}{n - r + 1/2} \right)$$

con una varianza estimada por:

$$V = \frac{(n + 1)(n + 2)}{n(r + 1)(n - r + 1)}$$

La anterior es una forma modificada la cual permite hacer cálculos para observaciones que incluyan ceros.

## VÍ. RESULTADOS

El presente estudio fue realizado en tres etapas, comprendiendo la primera el estudio de los alelos del complemento (complotipos) en población abierta de 55 pacientes con Espondilitis Anquilosante (EA) y 50 pacientes con Síndrome de Reiter (SR) comparados con 175 individuos normales, todos ellos fueron mestizos mexicanos.

En esta misma etapa, se incluyó otro marcador, cuyo gen se localiza también en el brazo corto del cromosoma 6 humano y que es la enzima glioxalasa I, se escogió este marcador debido a que solamente tiene dos alelos (GLO\*1 y GLO\*2) (42), los cuales, se heredan en forma codominante y por tanto pueden dividir marcadores genéticos en solamente dos tipos (41).

En la segunda etapa, se estudiaron los genes HLA-A y HLA-B en 10 pacientes con EA y en 19 con SR, tratando de establecer si existe relación entre los genes del sistema HLA, los genes del complemento y el gen de la GLO I.

Finalmente, la última etapa comprendió el estudio de los genes del complemento, de la GLO I y del sistema HLA en 11 familias de los sujetos (pacientes) ya previamente estudiados.

Todas las tipificaciones de los genes del complemento realizadas en los 55 pacientes con EA y en los 50 con SR son mostradas en las tablas 8 y 9 respectivamente. En estas mismas tablas se coloca el alelo de la GLO I tipificado para cada cromosoma de todos los pacientes.

En primer lugar, se establecieron las frecuencias génicas de los alelos del complemento, éstos fueron analizados en los tres grupos de estudio y los datos se muestran en la tabla 10. Puede notarse que se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los alelos C4A\*Q0 y C4A\*4 del locus C4A, los cuales se presentaron disminuidos en los pacientes con EA al ser comparados con los sujetos control y también con los pacientes con SR; por otro lado, el C4A\*3 del mismo locus, se encontró incrementado en el grupo de enfermos con EA.

**TABLA 8: COMLOTIPOS Y ALELOS DE LA CLO TIPIFICADOS EN LOS 55 PACIENTES CON ESPONDILITIS ANQUILOSANTE.**

1.- SC30-2/SC01-1	29.- FC31-2/SC31-1
2.- SC31-1/SC31-1	30.- SC31-2/SC01-2
3.- SC30-2/SC31-2	31.- SC30-2/FC01-2
4.- SC31-2/SC31-1	32.- SC31-2/SC01-2
5.- SC42-2/SC01-2	33.- FC31-1/SC31-1
6.- FC31-1/SC61-1	34.- FC31-2/SC31-2
7.- SC31-2/SC30-2	35.- SC34-1/FC31-2
8.- SC31-2/SC21-2	36.- SC31-2/SC31-1
9.- SC31-2/SC31-2	37.- SC31-2/SC31-2
10.- SC31-2/SC30-2	38.- FC31-2/SC81-1
11.- SC31-2/SC31-2	39.- FC31-2/FC30-1
12.- SC31-2/SC31-2	40.- SC31-2/SC30-2
13.- FC31-2/SC02-2	41.- SC31-2/SC21-2
14.- SC31-2/SC31-1	42.- SC31-2/SC30-2
15.- SC30-2/SC01-1	43.- SC31-2/SC31-2
16.- SC31-2/SC11-1	44.- SC31-2/SC30-2
17.- SC31-2/SC31-2	45.- SC31-2/SC30-1
18.- FC31-2/FC30-2	46.- SC30-2/SC30-2
19.- SC31-2/SC31-1	47.- SC21-1/FC31-1
20.- FC31-2/SC01-1	48.- FC21-2/FC31-2
21.- SC31-2/SC31-2	49.- SC61-2/FC30-1
22.- SC31-2/SC01-1	50.- SC31-2/SC41-1
23.- SC31-2/SC31-2	51.- SC31-2/SC31-2
24.- SC31-2/SC31-2	52.- SC31-2/SC11-1
25.- SC31-2/SC31-2	53.- SC21-1/FC31-2
26.- SC30-2/SC01-1	54.- SC31-2/SC34-1
27.- SC31-2/SC30-1	55.- SC31-2/SC30-1
28.- SC31-2/SC30-1	

TABLA 9: COMLOTIPOS Y ALELOS DE LA GLO TIPIFICADOS EN LOS 50  
PACIENTES CON SINDROME DE REITER.

1.- SC31-1/SC31-2	26.- SC42-2/FC30-1
2.- SC31-2/SC30-1	27.- SC31-2/SC30-2
3.- FC31-2/SC31-2	28.- SC31-2/FC30-2
4.- SC42-2/SC31-1	29.- SC32-2/SC50-2
5.- SC31-1/SC01-2	30.- SC20-1/SC01-2
6.- SC42-2/SC31-1	31.- FC30-1/FC01-1
7.- FC31-2/SC51-2	32.- SC31-2/SC30-2
8.- SC40-1/SC31-1	33.- SC33-1/FC31-2
9.- SC31-2/SC31-1	34.- FC31-2/SC01-2
10.- SC31-1/SC01-1	35.- SC31-2/SC31-1
11.- SC42-2/SC31-1	36.- SC31-2/SC31-2
12.- SC31-1/SC01-2	37.- S1021-2/SC11-2
13.- SC31-1/SC30-2	38.- SC40-2/FC01-2
14.- SC32-2/SC00-1	39.- SC41-1/SC31-1
15.- FC30-1/SC01-2	40.- SC31-1/SC01-2
16.- SC32-2/SC30-2	41.- SC31-2/FC30-1
17.- SC32-2/SC31-2	42.- FC31-1/SC01-1
18.- SC42-2/SC01-2	43.- SC31-1/SC01-1
19.- SC32-2/SC31-1	44.- SC31-1/FC31-1
20.- SC42-2/SC31-2	45.- SC32-1/SC30-1
21.- SC31-1/SC11-2	46.- FC31-2/SC11-2
22.- SC31-2/SC11-2	47.- SC31-1/SC01-2
23.- SC30-2/SC31-1	48.- FC01-2/SC31-1
24.- SC31-2/SC31-2	49.- SC42-1/SC31-1
25.- SC31-1/SC31-1	50.- SC30-2/SC42-2

TABLA 10. FRECUENCIAS DE LOS ALELOS DEL COMPLEMENTO EN LOS PACIENTES CON EA, SR Y EN LOS CONTROLES NORMALES.

C4A	(n=110) EA	(n=100) SR	(n=350) NORMALES
0	.090 ** <sup>1</sup>	.14	.177
1	.018	.05	.011
2	.045	.02	.054
3	.8 * <sup>2</sup>	.66	.634
4	.018 ** <sup>3</sup>	.11	.105
5	---	.02	---
6	.018	---	.011
Otros	.009	---	.008
<b>C4B</b>			
0	.172	.18	.131
1	.790	.67	.705
2	.018 ** <sup>4</sup>	.14	.137
3	---	.01	.020
4	.018	---	.002
Otros	---	---	.002
<b>FB</b>			
S	.827	.83	.805
F	.163	.15	.171
S1	.009	.02	.005
F1	---	---	.017
<b>GLO</b>			
1	.281	.42 * <sup>5</sup>	.250
2	.719	.58 ** <sup>6</sup>	.750

<sup>1</sup> p < 0.05	2p < 0.1	* Incrementado con respecto a controles
<sup>2</sup> p < 0.001	2p < 0.002	
<sup>3</sup> p < 0.001	2p < 0.002	** Disminuido con respecto a controles
<sup>4</sup> p = 0.0005	2p = 0.001	
<sup>5</sup> p < 0.001	2p < 0.002	
<sup>6</sup> p < 0.001	2p < 0.002	

Con respecto al locus de C4B, se observó disminuída la frecuencia del alelo C4B\*2 en los pacientes con EA al compararlos con los sujetos normales ó con los pacientes con SR.

En el locus de la GLO I, el alelo GLO\*1 se encontró altamente incrementado en los pacientes con SR, en forma correspondiente el alelo GLO\*2 estuvo disminuido ya que como se dijo el gen de la GLO solo tiene dos alelos, ambos resultados presentaron una alta significancia.

En cuanto a los alelos del factor B y de C2, éstos se encontraron distribuidos sin diferencia en los grupos de sujetos enfermos y en los controles.

Después de analizar los alelos por separado, se procedió a analizar sus combinaciones, es decir, en forma de haplotipos ó de complotipos como también se les conoce, lo cual se muestra en la tabla 11. Como se observa, los complotipos SC31 y SC30 se encuentran incrementados significativamente en los pacientes con EA cuando se comparan con el grupo control, mientras que la frecuencia del SC42 se encuentra disminuída en el mismo grupo de enfermos.

TABLA 11. FRECUENCIAS DE LOS COMPLITIPOS EN LOS CROMOSOMAS DE PACIENTES CON EA, SR Y CONTROLES NORMALES.

Complotipo	(n=110) EA	p vs controles	(n=100) SR	p vs controles	(n=347) controles
SC31	0.490	<.05 * <sup>1</sup>	0.39	NS	0.374
SC42	0.009	<.001 ** <sup>2</sup>	0.08	NS	0.118
SC01	0.072	NS	0.11	NS	0.112
FC31	0.118	NS	0.07	NS	0.074
SC30	0.145	<.025 * <sup>3</sup>	0.08	NS	0.069
FC30	0.027	NS	0.05	NS	0.034
Otros	0.129	--	0.22	--	0.219

\* Incrementado con respecto a controles.

\*\* Disminuido con respecto a controles.

<sup>1</sup> 2p = NS

<sup>2</sup> 2p < 0.002

<sup>3</sup> 2p < 0.05

Dado que el SC31 fue el complotipo más frecuente en los tres grupos estudiados y encontrándose al mismo tiempo incrementado en los pacientes con EA, se asumió la existencia de subtipos de complotipos. Para poder subdividir a los complotipos se usó el gen estructural de la GLO 1 que es el correspondiente a la enzima glicoxalasa 1 con sus dos alelos GLO\*1 y GLO\*2, con la cual, cada complotipo se dividió en dos subtipos, el que tenía GLO\*1 y el que se acompañaba de la GLO\*2.

En la tabla 12 se presentan los 6 complotipos más comunes divididos por los alelos de la GLO, únicamente se presentan 95 cromosomas en EA y 78 en SR ya que los otros complotipos fueron excluidos dada su baja frecuencia y el hecho de que algunos únicamente se encuentran combinados con un alelo, es notorio el hecho de que el complotipo SC31 en los pacientes con EA se combina más comúnmente con la GLO\*2, mientras que en el SR lo hace con la GLO\*1, por otro lado, el complotipo SC01 se combina más con la GLO\*1 en EA, mientras que en SR se combina más con la GLO\*2.

TABLA 12. FRECUENCIA DE LOS COMPLITIPOS MAS COMUNES DIVIDIDOS POR ALELOS DE LA GLO EN EA, SR Y CONTROLES NORMALES.

Complotipo	EA		SR		Controles	
	GLO*1	GLO*2	GLO*1	GLO*2	GLO*1	GLO*2
SC31	8	46	23	16	47	83
SC42	0	1	1	7	4	37
SC01	5	3	3	8	15	24
FC31	3	10	2	5	9	17
SC30	4	12	2	6	5	19
FC30	2	1	4	1	5	7
	22	73	35	43	85	187
	95		78		272	

Para poder analizar la contribución de los dos marcadores (complotipos y GLO) a la enfermedad en los grupos de estudio, se seleccionó un método que distinguiera cuál es el gen primariamente involucrado, este método es el logístico empírico (MLE), el cual, tiene la ventaja de discriminar la influencia de dos marcadores cuando ambos se desvían de lo esperado asumiendo combinación -- aleatoria de los genes. En la tabla 13 se muestra la aplicación del método para establecer la asociación primaria ó secundaria de los marcadores con la enfermedad, analizándose solos y combinados en ambas enfermedades. Gracias a esta tabla, se puede establecer que la combinación de complotipos más GLO tiene un efecto importante sobre la enfermedad ya que tanto el SC31 GLO\*2 como el -- SC01 GLO\*1 tienen una frecuencia aumentada en los pacientes con EA, mientras -- que en los pacientes con SR la combinación SC01 GLO\*2 es la que se encuentra aumentada. Existen también combinaciones que tienen una frecuencia disminuida tal es el caso del SC31 GLO\*1 y el SC01 GLO\*2 en los pacientes con EA, y el -- SC01 GLO\*1 en los pacientes con SR.

El efecto significativo de los complotipos solos sobre la enfermedad es -- también revelado por este método, ya que como se observa en esta misma tabla, la frecuencia del complotipo SC42 se encontró disminuida y el SC30 incrementado en los pacientes con EA; este efecto no fue influido por la contribución de los alelos de la GLO. Por otro lado, también se logró establecer que los alelos de la GLO por sí solos influyen ó tienen un efecto en los pacientes con SR ya que como se observa en la misma tabla 13, cuando se tiene la combinación -- del complotipo SC31 con el alelo 1 de la GLO, el gen que tiene un efecto signi -- ficativo sobre la enfermedad es el alelo GLO\*1 que se encuentra aumentado en -- estos pacientes, lo anterior corrobora lo ya establecido desde la tabla 10 acer -- ca de la influencia de estos alelos en el SR.

Es importante notar que cuando se presenta la combinación del complotipo SC31 con los alelos de la GLO en EA, ambos marcadores tienen un efecto sobre -- la enfermedad, mientras que cuando esta misma combinación se presenta en SR, -- únicamente el marcador del alelo de la GLO es el que tiene un efecto sobre el padecimiento.

El MLE se analizó en tablas de distribución normal y los valores de "p" --

fueron establecidos en análisis de una y de dos colas, en la tabla 13 se observa que los valores que permanecieron significativos después del ensayo de dos colas fueron las combinaciones SC31 GLO\*1 y SC31 GLO\*2, así como el complotipo SC42 y el SC30 en EA, mientras que en SR permaneció elevada en forma significativa la participación del alelo GLO\*1.

TABLA 13. SIGNIFICANCIA ESTADISTICA DE ASOCIACION CON LA ENFERMEDAD DE LOS COMLOTIPOS SOLOS O COMBINADOS CON LOS ALELOS DE LA GLO EN LOS GRUPOS DE PACIENTES ESTUDIADOS.

	EA		SR	
	Resultado de la prueba.	valor de p	Resultado la prueba	valor de p
SC31 solo	-0.04	NS	0.25	NS
GLO*1 ó GLO*2	0.25	NS	2.07	< 0.05 *
SC31/GLO*1	-2.77	<0.01 *	1.35	NS
SC31/GLO*2	2.77	<0.01 *	-1.35	NS
SC42 solo	-2.18	<0.05 *	-0.61	NS
GLO*1 ó GLO*2	0.67	NS	0.73	NS
SC42/GLO*1 ó *2	1.38	NS	0.27	NS
SC01 solo	-1.07	NS	-0.48	NS
GLO*1 ó GLO*2	0.47	NS	0.30	NS
SC01/GLO*1	1.81	=0.05	-1.64	= 0.05
SC01/GLO*2	-1.81	=0.05	1.64	=0.05
FC31 solo	0.38	NS	-0.39	NS
GLO*1 ó GLO*2	0.51	NS	0.39	NS
FC31/GLO*1 ó *2	0.08	NS	0.97	NS
SC30 solo	2.21	<0.05 *	0.25	NS
GLO*1 ó GLO*2	0.29	NS	0.88	NS
SC30/GLO*1 ó *2	0.86	NS	-0.05	NS
FC30 solo	-0.41	NS	0.31	NS
GLO*1 ó GLO*2	0.39	NS	1.64	NS
FC30/GLO*1 ó *2	1.09	NS	1.02	NS

\* Ensayo de dos colas.

NS: Valor no significativo.

En la figura 6 se ilustran los resultados de la combinación de los complotipos y de los alelos de la GLO en los tres grupos estudiados. Unicamente el grupo de pacientes con EA difiere marcadamente de los otros dos grupos, particularmente en el incremento del haplotipo SC31 GLO\*2 y la disminución del complotipo SC42. El complotipo SC31 con sus dos subtipos GLO\*1 y GLO\*2, fue diferente en SR con respecto a los otros grupos; la variante de GLO\*2 fue más frecuente en los sujetos normales, mientras que la variante GLO\*1 lo fue en SR.

En la tabla 14 se muestran los fenotipos en las dos enfermedades tratando de establecer una relación entre ellas. Como puede notarse, fenotipos con el haplotipo SC31 GLO\*2 constituyen el 63.6% del total de pacientes con EA, mientras que el mismo fenotipo solamente representa el 28% en el grupo de pacientes con SR. Otra diferencia significativa entre los dos grupos se observa en el fenotipo portador del haplotipo SC31 GLO\*1, el cual, comprende el 38% en SR y solamente el 5.4% en EA. Los otros complotipos SC30 y FC31 no fueron divididos por los alelos de la GLO debido a su baja frecuencia.

Tratando de ser más esquemáticos en cuanto a las diferencias que existen entre ambas enfermedades sobre la presencia de ciertos fenotipos, los datos de la tabla 14 se muestran en la figura 7.

TABLA 14. FRECUENCIA DE LOS FENOTIPOS DE LOS PACIENTES CON ESPONDILITIS ANQUILOSANTE (EA) Y SINDROME DE REITER (SR).

Fenotipo	EA		SR	
	n	%	n	%
SC31-2/SC31-2	11	63.6	2	28
/SC31-1	4		3	
/SC30	10		3	
/FC31	1		1	
/SC01	3		0	
/Otros	6		5	
SC31-1/SC31-1	1	5.45	1	38
/SC01	0		6	
/SC42	0		4	
/Otros	2		8	
FC31/SC01	1	18.1	2	10
/Otros	9		3	
SC30/SC30	1	9.09	0	6
/SC01	3		0	
/Otros	1		3	
Otros/Otros	2	3.6	9	18
	55		50	

FIGURA 8. COMLOTIPOS SIGNIFICATIVOS EN EA, SR Y NORMALES

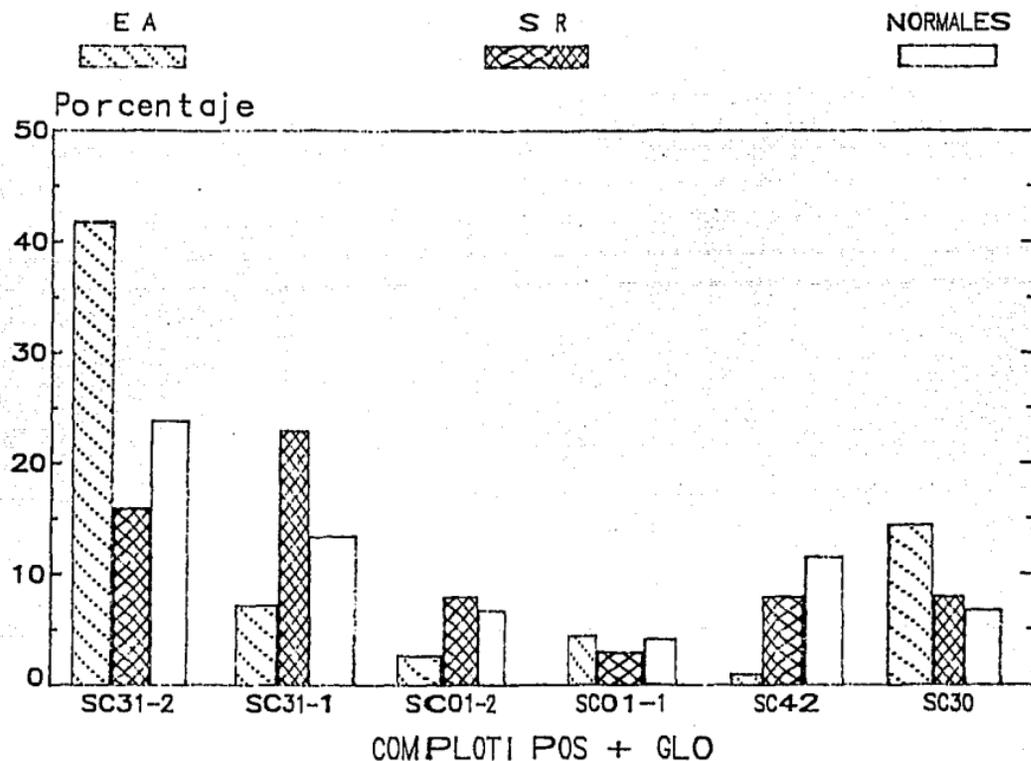
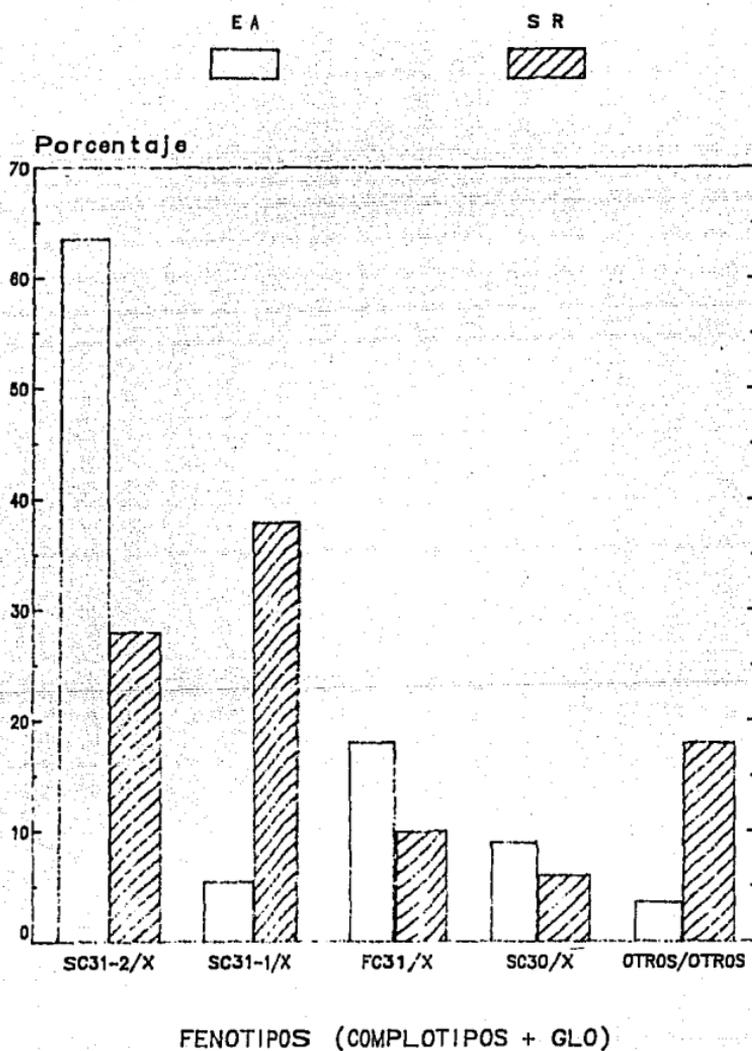


FIGURA 7. FRECUENCIA DE LOS FENOTIPOS EN PTES CON EA Y SR



Después de analizar los complotipos y los alelos de la GLO en los 55 pacientes con EA y en los 50 con SR, se tipificaron las moléculas de los genes - HLA-A y HLA-B en 29 pacientes, 10 con EA y 19 con SR, estos datos son mostrados en las tablas 15 y 16. respectivamente.

TABLA 15. HAPLOTIPOS TIPIFICADOS DE LOS 10 SUJETOS CON EA.

Paciente	Haplotipo	Paciente	Haplotipo
1	A28,B49,SC01-1 A33,B27,SC30-2 *	6	A2 ,B27,FC30-1* A11,Bx ,SC61-2
2	A1 ,B27,SC31-2 * A2 ,B5 ,SC31-1	7	A2 ,B27,SC31-2* A28,B27,SC41-1*
3	A2 ,B13,SC31-2 A31,Bx ,SC31-2	8	A2 ,B27,SC31-2* A24,B27,SC01-2*
4	A9 ,B35,SC01-1 A10,B27,SC30-2 *	9	A1 ,B27,FC31-2* A11,B50,S1C21-1
5	A2 ,B27,FC31-2 * A3 ,B51,FC21-2	10	A24,B35,SC30-1 A19,B27,SC31-2*

\* Haplotipos marcados con el antígeno HLA-B27

TABLA 16 HAPLOTIPOS TIPIFICADOS DE LOS 19 PACIENTES CON SR.

PACIENTE	HAPLOTIPO	PACIENTE	HAPLOTIPO
1	A9,B27, SC42-2* A25,B27,SC31-1*	11	A19,B5, SC31-1 Ax,B27, SC31-2 *
2	A2,B40, SC01-2 A10,B27,SC31-1*	12	A2,B14, SC11-2 A34,B50,SC021-2
3	A2,B27, SC31-1* A1,B5, SC30-2	13	A1,B39, SC40-2 A23,B39,FC01-2
4	A2,B27, SC30-1* A9,B15, SC32-1	14	A2,B27, SC41-1* A24,B14,SC31-1
5	A2,B21, SC10-2 A26,B41,SC32-1	15	A9,B51, SC31-1 Ax,Ex, SC01-2
6	A2,B27, SC32-2* A3,B27, SC30-2	16	A3,B51, FC30-1 Ax,B27, SC31-2 *
7	A1,B35, SC42-2 A2,B14, SC01-2	17	A26,B27,FC31-1* A30,Ex, SC01-1
8	A2,B7, SC32-2 A2,B14, SC31-1	18	A30,B13,SC01-1 A31,B27,SC31-1*
9	A2,B14, FC31-2 A2,B35, SC33-1	19	A2,B60, SC42-1 A11,B27,SC31-1*
10	A1,B8, SC01-2 A19,B27,FC31-2*		

\* Haplotipos marcados con el antígeno HLA-B27

De los 20 cromosomas tipificados para HLA-A y B en los 10 sujetos con EA, 11 (55%) portaban en antígeno HLA-B27 y solo un paciente fue HLA-B27 negativo en ambos cromosomas pero fue homocigoto para el SC31 GLO\*2; del total, 6 (30%) portaba el haplotipo SC31 GLO\*2 (asociado con la enfermedad según los datos anteriores) y únicamente 3 (15%) portaban el SC30 (también asociado con la enfermedad según el estudio de complotipos). De los 6 con SC31 GLO\*2, 4 (66%) portaban el B27 y de los 3 con SC30, 2 (66%) portaban este mismo antígeno.

Como puede notarse, los haplotipos que portan el antígeno B27 son heterogéneos con respecto a los complotipos y a la GLO de su mismo cromosoma. Llama la atención la participación de los complotipos SC30, FC30 y FC31, ya que en 31 cromosomas de individuos normales B27 positivos sólo en uno se presentó el SC30 y en ninguno se encontró el FC30 y el FC31, esto se muestra en la tabla 17.

De los 19 sujetos con SR tipificados se obtuvieron 38 haplotipos, de los cuales, 14 (36.8%) portaban el B27, encontrándose dos individuos homocigotos para este antígeno; 19 (50%) eran GLO\*1, y de estos, 9 (47%) además portaban el complotipo SC31; en total 5 (13%) eran B27 SC31-1. De los 38, 4 (10.5%) -- eran SC01 GLO\*2 (aumentado en estos pacientes según los datos del estudio de complotipos y GLO) y ninguno de éstos se acompañaba del B27.

Los haplotipos del SPH en los pacientes con SR muestran que aquéllos marcados por el B27 son diferentes de los encontrados en los pacientes con EA, ya que los complotipos SC31 están en posición Cis con respecto a la GLO\*1, lo cual ocurre también con el complotipo FC31, además aparecen complotipos como el SC42, el SC41 y el SC32, que no se detectaron en los cromosomas de los pacientes con EA.

Es muy interesante notar que los casos B27 negativos, están marcados por los complotipos señalados en el párrafo anterior o por otros complotipos considerados anormales (el SC11 y el SC21), por lo que al parecer son característicos de la enfermedad, con excepción del caso No. 15, el cual, ni es B27 ni presenta complotipos anormales.

TABLA 17: COMPLETOS Y ALELOS DE LA CLO EN 31 CROMOSOMAS  
DE INDIVIDUOS SANOS HLA-B27 POSITIVOS.

1.- SC31-2	17.- SC31-1
2.- SC01-2	18.- SC31-1
3.- SC31-1	19.- SC31-1
4.- SC31-1	20.- SC31-1
5.- SC31-1	21.- SC42-2
6.- SC31-1	22.- SC42-2
7.- SC30-1	23.- SC31-2
8.- SC31-1	24.- SC42-2
9.- SC31-1	25.- SC31-2
10.- SC31-2	26.- SC42-2
11.- SC31-2	27.- SC42-2
12.- SC31-2	28.- SC31-2
13.- SC31-2	29.- SC31-2
14.- SC31-1	30.- SC31-2
15.- SC31-1	31.- SC31-2
16.- SC31-1	

Una vez estudiados los genes HLA-A, HLA-B, complotipos y alelos de la GLO en algunos pacientes con EA y SR y con el propósito de precisar la interacción génica de estos marcadores decidimos estudiar a las familias nucleares (padre, madre y hermanos) de algunos de los pacientes. En total se tipificaron 11 familias, en 6 de ellas se logró tener los 4 haplotipos y en 5 se obtuvieron solo 3 haplotipos. A continuación se describen cada una de estas familias.

Familia 1 (figura 8). Como puede observarse, en esta familia todos los -- individuos portadores del haplotipo "a" (3 hombres y 2 mujeres) están enfermos, este haplotipo tiene la característica de llevar el antígeno B27 unido al SC31-2 y ser portado por el padre y su hermano. De los enfermos, dos de ellos, I-1 y II-1, tienen EA y el otro varón (I-2) padece uveítis anterior aguda. De las mujeres, II-4 padece SR, y II-5 tiene uveítis, mientras que las 2 mujeres que no heredaron el B27 SC31-2 (II-2 y II-3) no se les encontró evidencia clínica ó radiológica de enfermedad. Es importante notar que en esta familia la adquisición del haplotipo portador del B27 tiene tres expresiones clínicas de enfermedad (EA, SR y uveítis).

Familia 2 (figura 9). En esta familia existe un haplotipo paterno que porta el B27 y otro materno, el paterno va con el SC31-2 y el materno con el SC32-2. El caso índice es un varón que padece EA (II-1) y heredó el haplotipo paterno que va con el SC31-2, el cual, también fue heredado por dos de sus hermanas, quienes son haplo idénticas al caso índice y no se les encontró enfermedad clínica ó radiológica. El otro haplotipo portador del B27 (el materno) fue heredado por los sujetos II-3 (mujer) y II-5 (varón), quienes, a su vez, son haplo idénticos y ambos están enfermos, la mujer padece Artritis Reumatoide (AR) y el varón presenta SR según los datos clínicos. El padre del caso índice --- (I-1) padece psoriasis y no hay por el momento evidencia de artropatía psoriásica.

Familia 3 (figura 10). En ésta, tanto el caso índice (II-1), como su hermano (II-2) padecen Espondilitis Anquilosante Juvenil (EAJ), ambos son haplo idénticos y su cromosoma paterno está marcado por el B27 acompañado por el -- SC31-2, este haplotipo también es heredado por otro hermano del caso índice - (II-3) pero difiere en el haplotipo heredado de la madre y es clínicamente --

sano, al igual que que los individuos II-5 y II-6, quienes son producto de otro matrimonio por la rama materna.

Familia 4 (figura 11). El caso índice (la hija) padece EA y uno de sus haplotipos está marcado por el B27 y éste fue heredado del padre, el cual, además de padecer EA, presenta también AR.

Familia 5 (figura 12). En esta familia, el caso índice es un varón que padece SR y en uno de sus haplotipos porta el B27 que se acompaña con el SC31-1, este haplotipo es heredado por un hijo (II-1) y una hija (II-2) que difieren - por tanto en el haplotipo materno, la hija padece SR y el hijo es clínicamente sano, al igual que la otra hija (II-3) quien heredó de su padre el haplotipo - "a" que no porta el B27.

Familia 6 (figura 13). En ésta, el caso índice (I-1) padece EA, y en uno de sus haplotipos porta el B27 acompañado por el SC31-1. Uno de sus hijos (II-2), hereda este haplotipo y también padece EA y el otro hijo (II-1) padece uveítis y heredó de su padre el haplotipo "a" que no porta el B27.

Familia 7 (figura 14). En esta familia existen dos haplotipos marcados por el B27, uno portado por el padre (el "a") y el otro por la madre (el "d"), en el padre va acompañado por el SC31-2, y en la madre por el SC01-2. El caso índice (II-2) es un varón que padece EA y que heredó los dos haplotipos -- B27 (homocigoto). Sus hermanos, una mujer (II-1) y un varón (II-3) son haplotípicos y en uno de sus haplotipos (el "a") porta el B27 SC31-2 heredado del padre y el haplotipo "d" heredado de la madre, ambos sujetos son clínicamente sanos.

Familia 8 (figura 15). El caso índice es un varón (II-1) que padece SR y que en uno de sus haplotipos (el "c") porta el B27 acompañado del SC31-1 heredado de la madre; la hermana del caso índice (II-2) no comparte con el ningún haplotipo siendo homocigota para el SC31-2, ella está clínicamente sana.

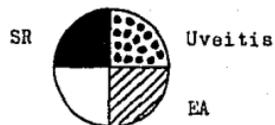
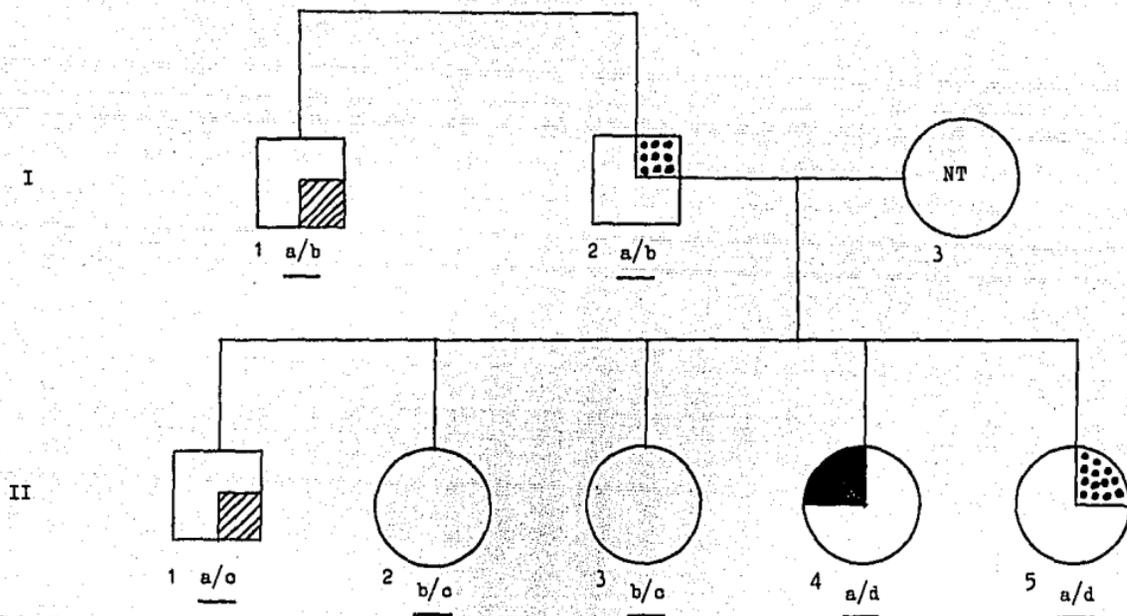
Familia 9 (figura 16). En ésta, el caso índice es un varón (II-1) que padece SR y en uno de sus haplotipos (el "c") porta el B27 heredado de la madre,

del padre heredó el haplotipo "a" que no lleva el B27.

Familia 10 (figura 17). En esta familia, el caso índice es un varón (II-1) que padece SR pero uno de sus haplotipos no fue tipificado (el "d") y en su otro haplotipo (el "a") no porta el B27 pero porta la combinación SC31-1. Su hermana (II-2) no comparte con él ningún haplotipo y de manera interesante -- también padece SR.

Familia 11 (figura 18). El caso índice en esta familia es una mujer (II-1) que padece SR y en ninguno de sus haplotipos porta el B27.

FIGURA 8 : FAMILIA No. 1



HAPLOTIPOS:

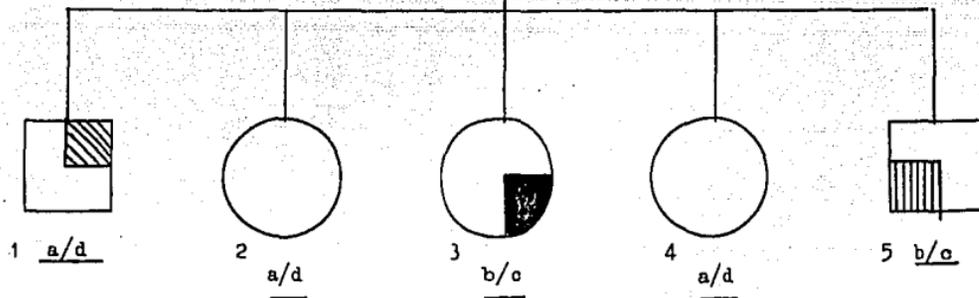
- a). A2 , B27, SC31-2 \*
- b). A28, B35, SC31-1
- c). A2 , Bx , FC31-1
- d). A28, B22, SC41-1

FIGURA 9 : FAMILIA No. 2

I



II



Psoriasis



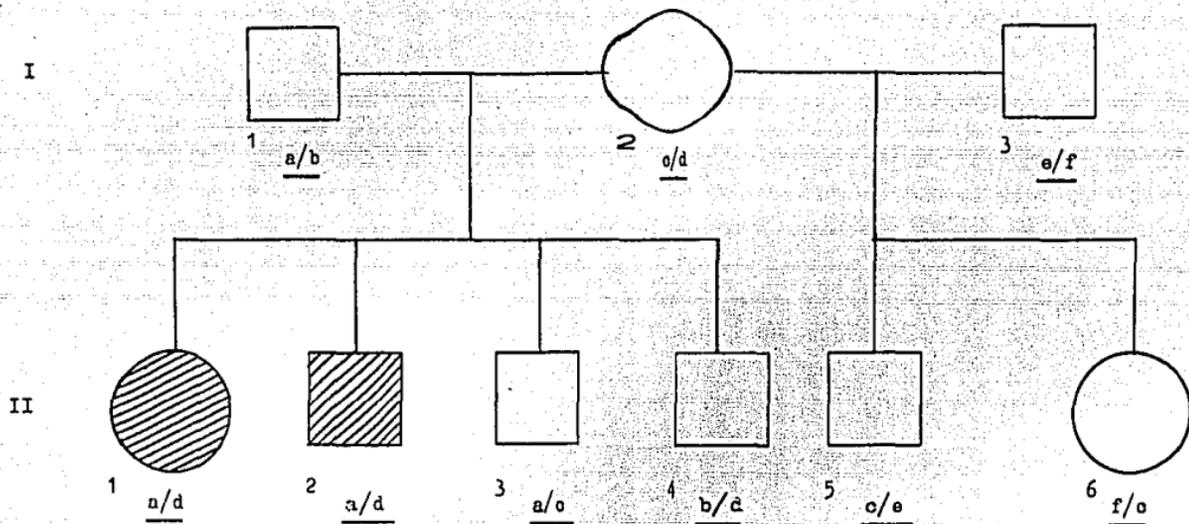
EA

SR

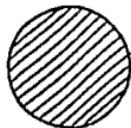
AR

HAPLOTIPOS:

- a). A3 , B27 , SC31-2 \*
- b). A2 , B5 , SC20-1
- c). A2 , B27 , SC32-2 \*
- d). A28 , Bx , SC31-1

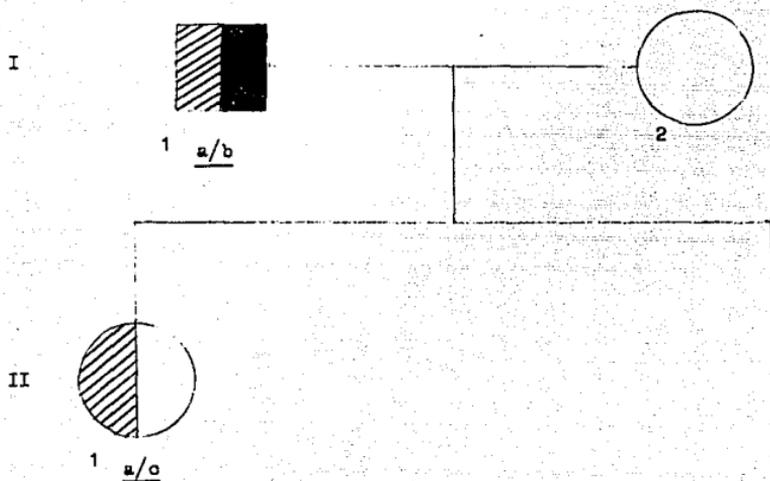


NAJ



HAPLOTIPOS:

- a). A2 , B27 , SC31-2 \*
- b). Ax , B7 , SC30-1
- c). A1 , B7 , SC31-2
- d). A2 , B8 , SC42-2
- e). A24 , B61 , SC01-2
- f). A1 , B17 , FC30-2

FIGURA 11: FAMILIA No. 4

## HAPLOTIPOS:

- a). A11, B27, FC31-1 \*
- b). A25, B58, SC62-2
- c). A1 , B50, S1C21-2
- d).

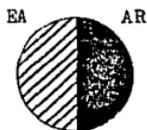
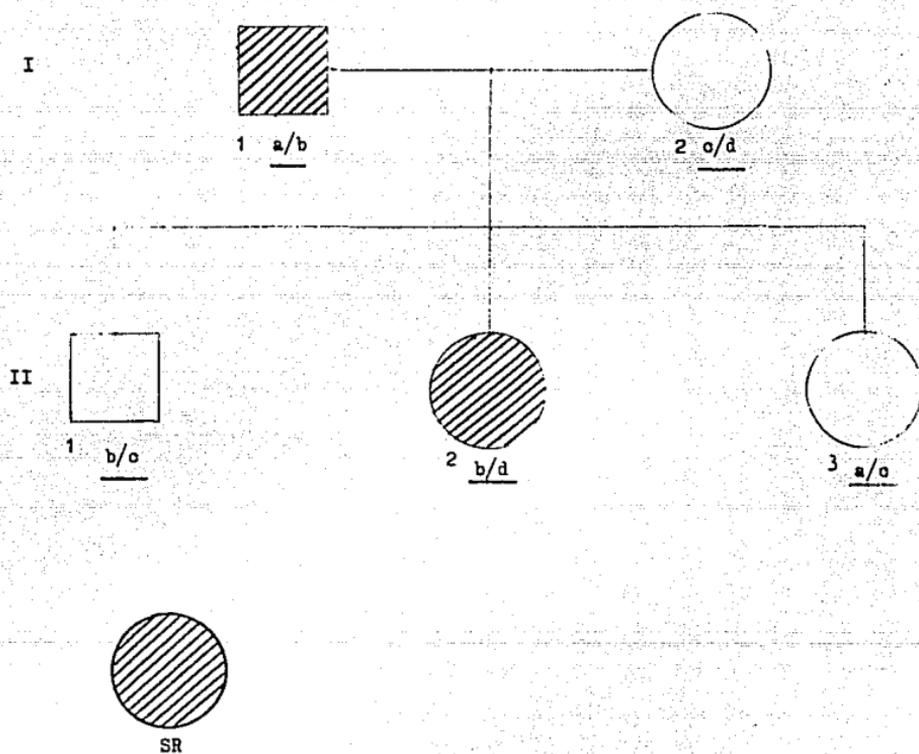
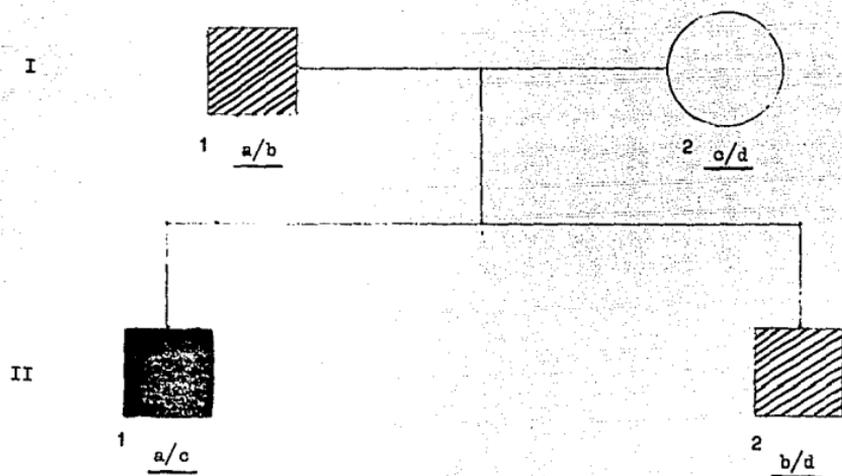


FIGURA 12 : FAMILIA No. 5

## HAPLOTIPOS:

- a). A11, B52, SC30-2
- b). A26, B27, SC31-1 \*
- c). A3, B44, FC31-2
- d). A24, B61, SC61-2

FIGURA 13: FAMILIA No. 6

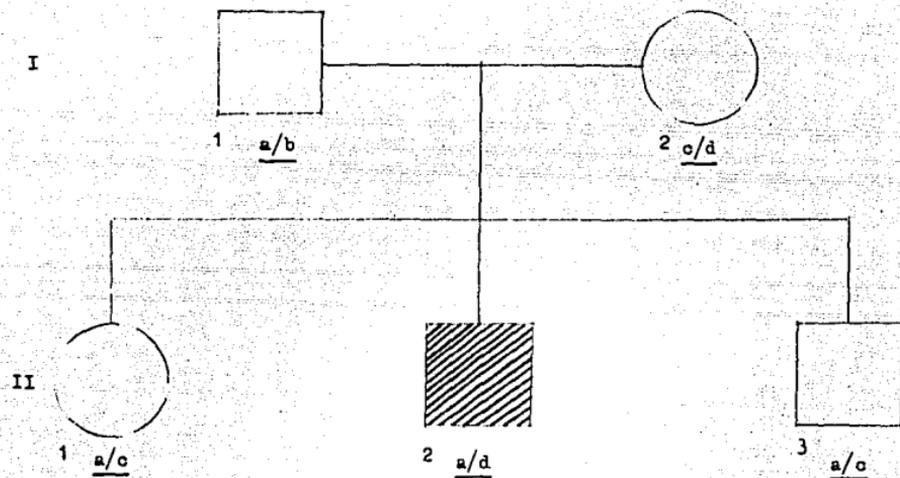
Uveitis



EA

## HAPLOTIPOS:

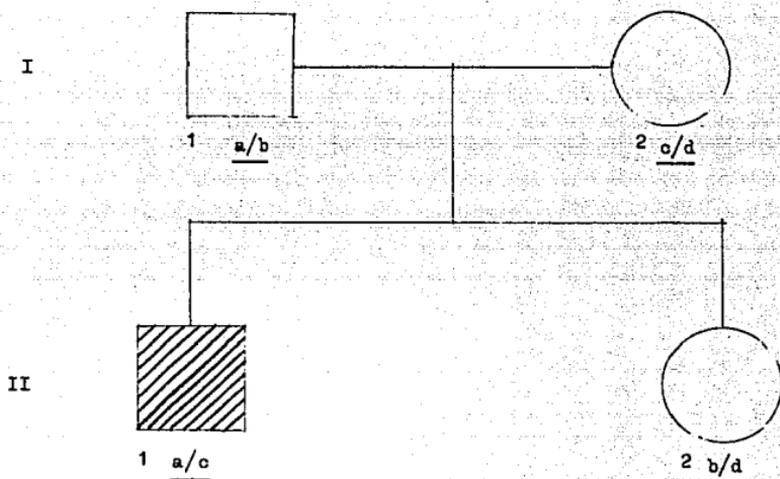
- a). A24, B51, FC61-1  
 b). A24, B27, SC31-1 \*  
 c). A1, B8, SC01-2  
 d). A3, B44, SC30-1

FIGURA 14 : FAMILIA No. 7

EAJ

## HAPLOTIPOS:

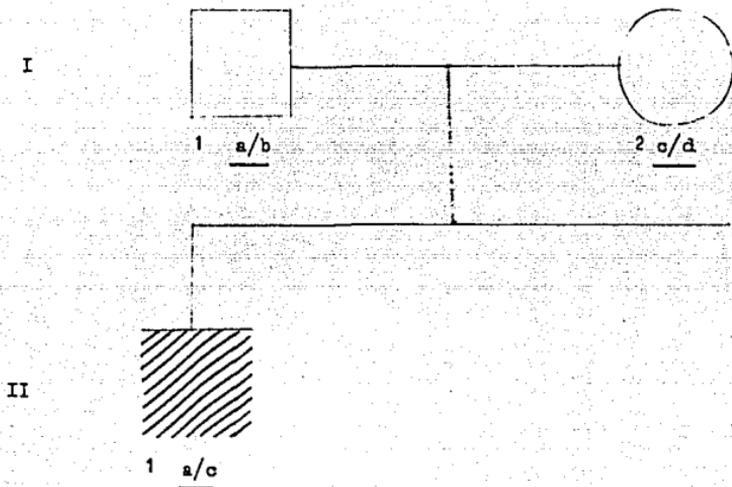
- a). A24, B27, SC31-2 \*
- b).
- c). Ax , B51, SC31-1
- d). A2 , B27, SC01-2 \*

FIGURA 15 : FAMILIA No. 8

## HAPLOTIPOS:

- a). A2 , B60, SC42-1
- b). A31, B14, SC31-2
- c). A11, B27, SC31-1 \*
- d). A19, B35, SC31-2

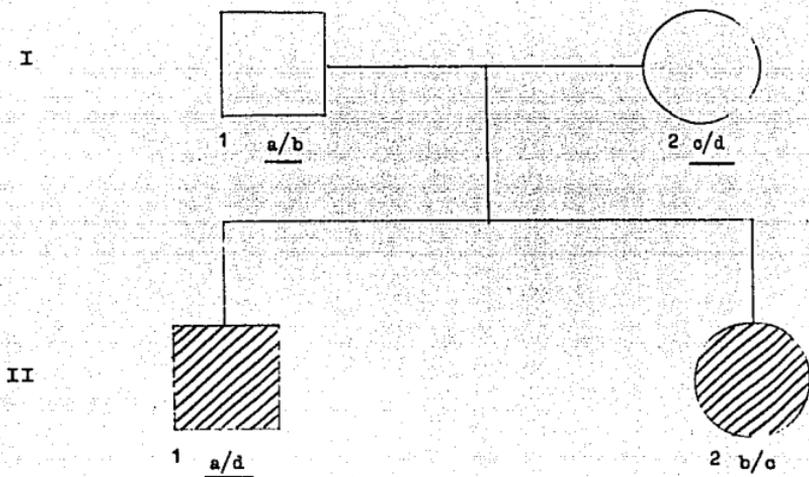
FIGURA 16 I H FAMILIA N.º. 9



SR

HAPLOTIPOS:

- a). A2 ,B51,FC30-1
- b).
- c). A2 ,B27,SC42-2\*
- d). A24,B61,SC30-2

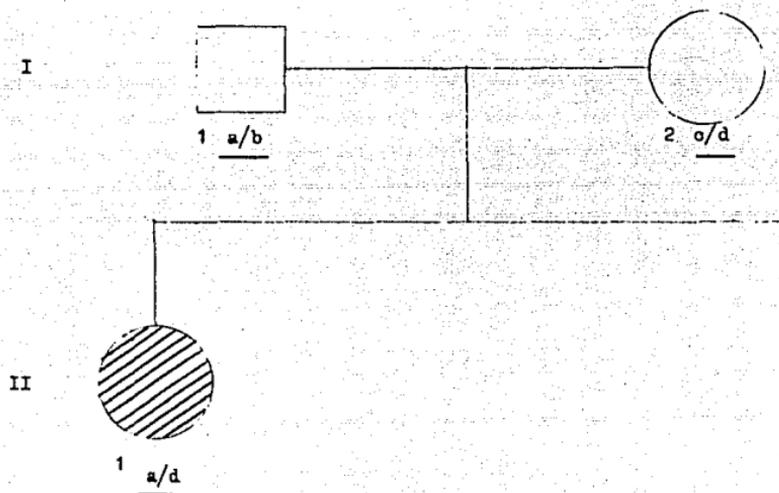
FIGURA 19 : FAMILIA No. 10

SR

## HAPLOTIPOS:

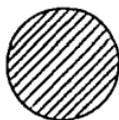
- a). A2 , B44, SC31-1
- b). A30, B35, SC31-2
- c). Ax , B14, SC32-2
- d).            , FC31-1

FIGURA 18 : familia No. 11



## HAPLOTIPOS:

- a). A24, B17, SC01-1
- b).
- c). A3 , B35, SC30-2
- d). A25, B61, FC31-1



SR

## VI. D I S C U S S I O N

Cuando se compararon los alelos individuales de los genes del complemento entre los tres grupos (tabla 10), el alelo nulo de C4A (C4A\*Q0) se encontró disminuido significativamente en los pacientes con EA cuando se compararon con los individuos normales. El alelo C4A\*3 está incrementado significativamente en EA comparado con los controles, a pesar de que éste fue el alelo que se presentó con mayor frecuencia en los tres grupos. Por otro lado, este mismo alelo fue más frecuente en los pacientes con SR comparado con los controles, pero esta diferencia no fue significativa.

La frecuencia disminuida de C4A\*4 y C4B\*2 en los pacientes con EA no es sorprendente ya que, esos dos alelos tienden a presentarse simultáneamente en el mismo cromosoma con una frecuencia diferente de lo que se esperaría dada su frecuencia individual (estos dos alelos presentan desequilibrio de ligamiento). Por otro lado, en los pacientes con SR ninguno de los alelos del complemento mostró diferencia significativa al compararlos con los sujetos control; en estos pacientes los alelos de la GLO fueron los que se encontraron alterados, presentándose una frecuencia elevada de la GLO\*1 y disminuida la GLO\*2 ambos con significancia elevada.

Después del análisis de los alelos del complemento y la GLO por separado, se procedió a analizar las combinaciones de los primeros, es decir, los complotipos (tabla 11). La razón por la cual el alelo C4A\*3 se encuentra aumentado se observa claramente en la tabla, ya que, este alelo está comprendido en los complotipos SC33, SC30 y FC30 y dos de estos complotipos (SC31 y SC30) se encuentran elevados significativamente en los pacientes con EA. En la tabla se puede notar también la disminución del complotipo SC42 en los pacientes con EA indicando el ya mencionado desequilibrio de ligamiento entre C4A\*4 y C4B\*2. Es importante señalar que este complotipo SC42 es el segundo más común en la población mexicana normal (32).

Debido a que el complotipo SC31 fue el más común en los tres grupos de -- estudio se puede pensar la existencia de subtipos de complotipos. En la tabla 12 se muestran los 6 complotipos más comunes divididos por alelos de la GLO -- que presenta únicamente dos alelos (GLO\*1 y GLO\*2).

Por otro lado, en esta misma tabla se muestra claramente que la relación complotipo-alelo de la GLO está siempre orientado al predominio de la GLO\*2 en los sujetos normales y en los pacientes con EA, mientras que en los pacientes con SR ocurre todo lo contrario, siendo predominante la GLO\*1. Esto anterior sugiere que los alelos de la GLO juegan un papel importante en la susceptibilidad genética a esas dos EAP ya sea solos ó combinados con cierto complotipos.

En la tabla 12 se analizan los complotipos que dada su frecuencia fue posible dividir en alelos de la GLO. Otros complotipos solamente existen combinados con un alelo de la GLO ya sea con GLO\*1 ó con GLO\*2 y éstos no se analizaron, motivo por el cual sólo se presentan 95 cromosomas de pacientes con EA y 78 de SR.

Como se puede ver, en pacientes con EA, el complotipo SC31 está primor-- dialmente combinado con GLO\*2, mientras que en SR se presenta combinado con -- GLO\*1. El SC01 esta combinado más comunmente con GLO\*1 en los pacientes con EA, mientras que se combina con GLO\*2 en los de SR. Con los demás complotipos no se encontraron diferencias en su combinación con GLO\*1 ó GLO\*2 en las dos - enfermedades.

Para poder analizar las diferencias que existen entre estas dos enferme-- dades con respecto al efecto de la combinación de los marcadores del comple-- mento más marcadores de la GLO, se seleccionó el método logístico empírico --- (MLE) (34). Este método ha sido establecido para analizar la asociación de en fermedades con los marcadores del SPH, especialmente cuando estos marcadores - se localizan muy cerca uno del otro en el mismo cromosoma y ambos se asocian - con la misma enfermedad, además, este método ayuda a establecer qué marcador se asocia primariamente con la enfermedad y cual tiene una asociación secunda-- ria. Finalmente, tiene también la ventaja de medir el efecto de 2 marcadores sobre la frecuencia de la enfermedad ya sea sólo ó combinados, dando una idea

cuantitativa de este efecto.

Como se observa en la tabla 13, los complotipos SC31 y SC01 en los pacientes con EA tienen un efecto sobre la enfermedad únicamente cuando se combinan con los alelos de la GLO, sugiriendo una interacción de esos dos marcadores, mientras que la disminución del SC42 y el aumento del SC30 en estos mismos pacientes no está influida por el efecto de los alelos de la GLO. Por otro lado, en los pacientes con SR el complotipo SC01 tiene un efecto sobre la enfermedad solamente cuando se encuentra combinado con los alelos de la GLO, mientras que cuando se presenta la combinación del complotipo SC31 con los alelos de la GLO en estos pacientes, únicamente tienen efecto sobre la enfermedad éstos últimos alelos. Los complotipos FC31 y FC30 se muestran únicamente para comparación ya que sus valores no fueron significativos al analizarlos sólos ó combinados con los alelos de la GLO.

Es importante establecer que cada individuo tiene 2 haplotipos (complotipos más alelos de la GLO), uno en cada cromosoma, heredado de cada uno de los padres, dando ambos el fenotipo del individuo. Estos fenotipos fueron analizados en la tabla 14 para cada una de las enfermedades. El número de individuos homocigotos para el fenotipo SC31 GLO\*2 es mayor en la población de pacientes con EA que en los de SR como se puede observar en esta tabla. Los fenotipos con el haplotipo SC31 GLO\*2 se encuentran más frecuentemente en EA que en SR comprendiendo en los primeros el 63.6% de todos los fenotipos y únicamente el 28% en los segundos. Por el contrario, los fenotipos con el haplotipo SC31 GLO\*1 tienen una frecuencia mayor en los pacientes con SR que en los de EA comprendiendo un 38% y un 5.4% respectivamente de todos los fenotipos. Finalmente, los porcentajes de los demás fenotipos mostrados en la tabla presentan notables diferencias en una y otra enfermedad, estableciéndose, en suma, una posible interacción directa de los complotipos y alelos de la GLO en el desarrollo de las EAP. El papel que juegan esos genes no está aún bien establecido, pero podría encontrarse a nivel del manejo del antígeno extraño, pues se considera que este tipo de enfermedades son disparadas por agentes bacterianos específicos tales como Klebsiella, Salmonella, Shigella y Campylobacter (20, -21, 39, 87).

Como se muestra en la figura 6, el haplotipo SC31 GLO\*2 es característico de los pacientes con EA, mientras que en los de SR lo es el SC31 GLO\*2. Con respecto al complotipo SC01, el cual, difiere del SC31 únicamente en el alelo del locus C4A, se encontró combinado más frecuentemente con la GLO\*2 en los pacientes con SR al igual que en los sujetos normales y por el contrario en los pacientes con EA se combina más con la GLO\*1 lo cual, se observa claramente en la gráfica (fig. 6). Por otro lado, también se observa diferencia entre los haplotipos SC01 GLO\*1 y SC31 GLO\*1 en los pacientes con SR, encontrándose el primero disminuido y el segundo incrementado con respecto a los controles.

El complotipo SC42 se encontró marcadamente disminuido en los pacientes con EA, a pesar, de que éste fue el segundo complotipo más común en la población normal. Este hallazgo está probablemente sesgado, debido a que este complotipo se ha observado en pacientes con EAJ (33) y nuestra población de estudio únicamente comprende pacientes adultos, sugiriendo que todos los individuos susceptibles con este complotipo pueden adquirir la enfermedad en una edad temprana (antes de la pubertad) y por tanto no fueron considerados en nuestro estudio.

Finalmente, la frecuencia aumentada del complotipo SC30 en pacientes con EA (fig. 6) cuyo efecto sobre la enfermedad no está influido por los alelos de la GLO (tabla 13), sugiere que este complotipo puede estar primariamente involucrado en esta enfermedad. Por otro lado, este complotipo es particularmente importante debido a que porta un alelo nulo en el locus C4B y ésta es una característica asociada con el desarrollo de otras enfermedades reumáticas como la Esclerosis Progressiva Generalizada (55), además, es importante mencionar que este complotipo se ha encontrado asociado con la Enfermedad Inflamatoria Intestinal en pacientes mestizos mexicanos (6).

En los datos del HLA, complotipos y GLO en los 10 pacientes con EA puede notarse que existe interacción del HLA-B27 con los complotipos y la GLO sólo cuando están en el mismo cromosoma, este dato está apoyado por la baja frecuencia de homocigotos para el B27 aún cuando este antígeno está presente en el 90% de los pacientes con esta enfermedad (70).

El cromosoma homólogo de este grupo es muy heterogéneo apoyando nuevamente la noción de interacción Cis.

Por otra parte, en los casos 6 y 9, el cromosoma homólogo porta un haplotipo que está compuesto por genes en una combinación mayor a lo esperado según sus frecuencias individuales, es decir, que no está en equilibrio genético (no se combina aleatoriamente con los alelos de los otros genes). Estos haplotipos están bien caracterizados en la población caucásica y se les conoce como haplotipos extendidos (10).

En individuos mestizos mexicanos la aparición de estos haplotipos probablemente se debe a incorporación por mestizaje, ya que por un lado su frecuencia es baja y por otro las poblaciones indígenas no los presentan (30).

La interacción Cis entre el HLA-B27, los complotipos y la GLO sugiere que probablemente constituyen un haplotipo extendido de susceptibilidad a EA.

Con respecto a los haplotipos del SPH en los pacientes con SR se apoya -- la noción del párrafo anterior, porque los haplotipos HLA-B27 tienen no sólo -- complotipos diferentes sino también alelos de la GLO distintos. En estos pacientes nuevamente resalta la ausencia de homocigotos B27, y ya se señaló al -- referirse a los complotipos también se nota la disminución de homocigotos para el complotipo SC31 que es el más frecuente.

Con respecto a los casos B27 negativos, debe notarse que están marcados preferentemente por el HLA-B14, el HLA-B39 y por los complotipos SC01, SC32 -- y SC42, sugiriendo que estos marcadores genéticos parecen interactuar para con -- ferir susceptibilidad genética al desarrollo del SR en individuos mestizos mexicanos.

Todos los datos anteriores obligan a estudiar su participación mediante -- un análisis más detallado, lo que se hace en seguida mediante el estudio de -- las familias nucleares de los pacientes.

Familia 1: El caso índice tiene SR y tanto su hermano con EA, hermana y padre con uveítis y tío paterno con EA comparten el mismo cromosoma B27 SC31-2.

La diferencia en el cromosoma homólogo de los pacientes parece influir en el fenotipo del padecimiento. También es interesante que las mujeres que no heredaron el cromosoma B27 son sanas hasta el momento.

En la familia 2 el caso índice con EA de inicio en la infancia está marcado por el B27 SC31 GL0\*2 el cual, heredó del padre quién a su vez tiene psoriasis, una enfermedad muy rara en mestizos mexicanos, pero relativamente frecuente en individuos de origen español (86), sugiriendo con ello el origen del cromosoma; en esta familia la madre también tiene un cromosoma B27 que difiere del de su esposo en el complotipo con el que se asocia, este cromosoma materno B27 SC32 GL0\*2 distingue al SR de la EA.

Como se nota en el árbol genealógico una hermana (11-3) que es haploidéntica al caso de SR padece AR pero no SR, lo que puede deberse a que existen genes en otra parte del genoma que se requieren junto con los genes del SPH para producir AR, entre ellos están los genes del receptor de la célula T (36) y los genes para las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas (69), entre otros, ó probablemente esta paciente (11-3) presenta una alteración a otro nivel, la cual, no fue heredada por su hermano haploidéntico (11-5). Otra explicación es que estas enfermedades son desencadenadas por agentes infecciosos específicos e independientes (25) y en general a que son enfermedades multifactoriales.

En la familia 3 el caso índice (11-1) que padece EAJ está nuevamente marcado por el B27 SC31-2, su único hermano haploidéntico (11-2) también padece EAJ, este cromosoma es de origen paterno y a pesar de ser heredado por el hermano 11-3, él no presenta ningún padecimiento hasta el momento, sin embargo, se sugiere que deba vigilársele a largo plazo. Una alternativa que explica su estado de salud, a pesar de tener un marcador de susceptibilidad, es que en esta familia la enfermedad requiere también del cromosoma homólogo, que en el caso de los enfermos está marcado por el complotipo SC42 y en el individuo sano por el SC31 GL0\*2.

Familia 4: En esta familia el caso índice (I-1) que tiene dos enfermedades (EA y AR) al transmitir a su hija el haplotipo de tipo B27 FC31-2 dió lugar a que heredase la susceptibilidad a EA, apoyando con esto la noción de que hay pacientes con dos enfermedades debido a que poseen dos marcadores genéticos independientes para cada una de ellas.

En la familia 5, la transmisión de padre a hija del haplotipo portador -- B27 SC31-1 y el SR apoya la noción de no preferencia por el sexo en esta enfermedad y también de alguna manera la noción de poca participación de factores hormonales.

En la familia 6 el caso índice (I-1) marcado por el B27 padece EA y transmite el haplotipo portador del B27 a su hijo II-2 quien también padece EA, su hermano quien tiene uveítis que es un padecimiento también relacionado con la presencia del B27 (38), no heredó el antígeno B27, pero de su madre heredó un haplotipo marcador de autoinmunidad, el A1 A1 B8 SC01 GLO\*2 (65) sugiriendo con ello el origen probable autoinmune de la uveítis del paciente II-1.

En la familia 7 el caso índice con EA y AR es el único individuo de la familia que es homocigoto para el B27 nuevamente apoyando la noción de que las formas juveniles se presentan a esa edad debido a que los individuos nacen con mayor carga genética.

Familia 8: En esta familia el caso índice (SR) heredó el B27 de la madre y su hermana que es totalmente distinta está sana y tiene haplotipos normales resaltando con ello la relevancia del B27.

En esta enfermedad, es de notarse que el B27 está en el cromosoma en posición Cis con el plotipo SC31 GLO\*2 que parece como ya se dijo parece distinguir al SR de la EA.

En la familia 9, el caso índice tiene el cromosoma B27 marcado por el plotipo SC42 GLO\*2 que también es característico del SR pero no existe en EA.

Finalmente, en las familias 10 y 11 los tres pacientes son B27 negativos y padecen una EAP seronegativa que clínicamente es muy parecida entre los tres

pacientes, pero que como puede notarse genéticamente son muy diferentes desde el punto de vista de sus haplotipos del SPH. A pesar de que dos son hermanos entre sí, tal vez lo que tienen en común y que parece ser relevante para la enfermedad es que son homocigotos para los alelos de la GLO, dos casos para la GLO\*1 y el otro para la GLO\*2, apoyando el concepto de que este gen por sí solo participa en la fisiopatogenia de las espondiloartropatías.

## VIII. C O N C L U S I O N E S

1.- En primer lugar, el estudio realizado nos permite establecer la existencia de nuevos marcadores asociados con la EAP, además del HLA-B27 ya reportado. El estudio de los complotipos y alelos de la GLO como nuevos marcadores de estos padecimientos tiene la ventaja de que éstos se localizan en el mismo cromosoma que el sistema HLA y a una distancia muy pequeña, razón por la cual puede analizarse en forma fina el desequilibrio genético entre este grupo de genes, utilizando como herramienta importante el estudio de las familias nucleares de los individuos afectados. Los marcadores identificados que al parecer participan en la fisiopatogenia de las EAP son el complotipo SC30 y las combinaciones SC31-2 y SC01-1 en la EA; el alelo 1 de la GLO así como la combinación SC01-2 en el SR.

2.- Por otro lado, existe una interacción significativa entre los complotipos y los alelos de la GLO, los cuales, al parecer también interactúan con el sistema HLA principalmente el locus B, tanto en el mismo cromosoma como en el cromosoma homólogo.

3.- Gracias a la utilización de los dos marcadores (complotipos y alelos de la GLO) en los pacientes con EA y en los de SR, es posible separar a estos dos padecimientos, los cuales, dada su semejanza eran muy difíciles de diferenciar aún con la utilización del marcador HLA-B27 ya que tanto la EA como el SR se asocian a la presencia de este antígeno.

Como muestran nuestros datos, existe una diferencia fundamental en la presencia del haplotipo SC31 GLO\*2 y del SC31 GLO\*1, ya que el primero es característico de la EA y el segundo lo es del SR.

4.- La detección de deficiencias parciales del complemento, tal es el caso -- del complotipo SC30, cuya frecuencia se encuentra aumentada en los pacientes con EA, añade un punto concreto a la fisiopatogenia de la enfermedad, partiendo del hecho de que estas enfermedades son al parecer disparadas por agentes infecciosos. El presentar una deficiencia parcial del complemento impide que el individuo pueda defenderse adecuadamente de los diferentes agentes patógenos que lo atacan.

5.- El haber detectado un complotipo como lo es el SC42 con una frecuencia muy disminuida en los pacientes con EA (se debe de corroborar si hay sesgo en nuestros datos), permite darle el carácter de protector, es decir, los individuos que presenten este complotipo tendrán muy poca probabilidad de desarrollar la enfermedad.

6.- Finalmente, el estudio de los complotipos como marcadores de susceptibilidad a nivel de familias, abre la posibilidad de tener una mayor vigilancia médica en aquellos sujetos que sin haber desarrollado la enfermedad tengan parientes enfermos y compartan con ellos alguno de estos haplotipos de predisposición, es decir, que estos sujetos supuestamente sanos puedan estar ya presentando algunas alteraciones consideradas preclínicas, las cuales, utilizando -- estos marcadores puedan ser identificadas, permitiendo a su vez el temprano -- tratamiento del individuo, y como consecuencia de ello mejor pronóstico con la terapéutica oportuna.

**IX. G L O S A R I O**

- 1.- Alelo. Una ó varias formas en que se puede presentar un gen.
- 2.- Alotipo. Diferencias fenotípicas entre los diferentes alelos de un -- locus.
- 3.- Anafilotoxina. Péptidos del complemento (C3a y C5a) los cuales causan gran degranulación celular y contracción del músculo -- liso.
- 4.- Asociación genética. Término usado que describe la condición de que -- un genotipo particular este asociado con otro fe -- nómeno, tal como enfermedades particulares.
- 5.- Anticuerpo. Una molécula producida por animales en respuesta a un an -- tígeno, la cual tiene la propiedad particular de combinar -- se con el antígeno que indujo su formación.
- 6.- Antígeno. Sustancia capaz de desencadenar una respuesta inmune en su -- contra.
- 7.- Autosoma. Otros cromosomas diferentes a los sexuales X y Y.
- 8.- Bactericida. Sustancia que mata a las bacterias.
- 9.-  $\beta$ H. Un cofactor del sistema del complemento recientemente llamado -- factor H.
- 10.-  $\beta$ -2-microglobulina. Un polipéptido el cual constituye parte de algunas -- proteínas de membrana incluyendo las moléculas -- clase I del SPH.
- 11.- Centimorgan. Unidades de recombinación que existen entre los genes.
- 12.- Codominante. Cuando ambos antígenos de un locus son expresados indepen -- dientemente, es decir, la presencia de un antígeno no su -- prime la expresión del otro.

- 13.- Complejo Inmune. El producto de una reacción Ag-Ac, la cual también puede contener componentes del sistema del complemento.
- 14.- Cromosoma. Cuerpo nucleoproteico microscópicamente observable, tñe oscuro con los colorantes básicos en las células durante la división celular. Portan a los genes que están colocados en orden lineal.
- 15.- Desequilibrio de ligamiento. Condición por la cual 2 genes se presentan combinados en la población con una frecuencia más alta que la que se esperaría dadas sus frecuencias individuales.
- 16.- Desialación. Eliminación de ácido siálico de las muestras.
- 17.- Dominante. Aquel alelo que para expresarse con ser heterocigoto es suficiente.
- 18.- Fagocitosis. Proceso por el cual las células engullen material y lo encierran en una vacuola.
- 19.- Fenotipo. Características expresadas de un individuo.
- 20.- Gen. Porción de material genético que codifica para una proteína.
- 21.- Gen nulo. Gen que no codifica para proteína.
- 22.- Genotipo. El material genético heredado de los padres; no todo este material es expresado necesariamente en el individuo.
- 23.- Glioxalasa I. Enzima eritrocitaria que cataliza la conversión de metilglioxal y glutatión a S-lactoil-glutatión.
24. Haplotipo. Un grupo de determinantes genéticos localizados en un mismo cromosoma.

- 25.- Histocompatibilidad. La habilidad de aceptar injertos entre individuos.
- 26.- Herencia multigénica. Herencia que depende de varios genes.
- 27.- Heterocigoto. Si hay dos diferentes antígenos en un locus.
- 28.- Homocigoto. Cigoto resultante de la unión de gametos de la misma especie.
- 29.- Loci.- Plural de locus.
- 30.- Locus. Posición que ocupa un gen en un cromosoma.
- 31.- Ligamiento. La condición por la cual 2 genes que están presentes muy próximamente en un mismo cromosoma y son generalmente heredados simultáneamente.
- 32.- Oponización. Un proceso por el cual es facilitada la fagocitosis -- por la deposición de opsoninas en el antígeno.
- 33.- Penetrancia. Influencia del medio ambiente sobre el genotipo.
- 34.- Polimorfismo. Cuando un locus puede presentar muchas variantes alélicas.
- 35.- Quimiotaxis. Migración direccional incrementada de células particularmente en respuesta a un gradiente de concentración ciertos factores quimiotácticos.
- 36.- Recombinación. Proceso por el cual la información genética es rearrangada durante la meiosis.

## X. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Agnello, V. (1978). Complement Deficiency States - *Medicine* 57(1);1-22.
- 2.- Alper, C.A., and Johnson, A.M. (1969). Immunofixation Electrophoresis: A technique for the study of protein polymorphism. *Vox Sang.* 17: 445-452.
- 3.- Alper, C.A., Boenisch, T., and Watson, L.J.L. (1972). Genetic polymorphism in Human glycine-rich beta-glycoprotein. *J. Exp Med.* 135: 68-80.
- 4.- Alper, C.A., Propp, R.P. (1968). Genetic polymorphism of the third component of human complement (C<sub>3</sub>). *J Clin Invest.* 47: 2181-2191.
- 5.- Alper, C.A., Raum, D., Karp, S., et al. (1983). Serum complement "supergenes" of the major histocompatibility complex in man (complotypes). *Vox Sang.* 45: 62-67.
- 6.- Andrade, F., Granados, J., Melín-Aldana, B., et al. (1987). Estudio inmunogenético en pacientes mexicanos con necrosis ulcerativa crónica inespecífica (CUCI). Sexta reunión de alumnos de Maestría y Doctorado en Biomedicina. Facultad de Medicina, UNAM, pp. 81.
- 7.- Arnett, F.C. (1984). HLA and spondylarthropathies. In: Calin, A. (ed): *Spondylarthropathies*. Grune and Stratton, Inc. 1984, pp. 297-321.
- 8.- Awdeh, Z.L., and Alper, C.A. (1980). Inherited structural polymorphism of the fourth component of human complement. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 3576-3580.
- 9.- Awdeh, Z.L., Raum, D., Alper, C.A. (1981). Major histocompatibility complex (MHC) linked complement haplotypes (complotypes). *Fed Proc.* 40: 1066-1069.
- 10.- Awdeh, Z.L., Raum, D., Yunis, E.J., and Alper, C.A. (1983). Extended HLA-complement-glyoxalase allele haplotypes: evidence for T/t-like complex in man. *Proc Natl Acad Sci USA*, 80: 259-263.

- 11.- Barnstable, C. J., Jones, E.A., and Crumpton, M.J. (1978). Isolation - structure and genetics of HLA-A, -B, -C and -DRw (1a) antigens. Br Med Bull. 34: 241-246.
- 12.- Bias, W., Chase, G.A. (1977). Genetics implications of HLA and disease association transplant. Proc Natl Acad Sci USA. 9: 531-542.
- 13.- Blake, N.M., and Redford, P.R. (1984). Detection of chromosome 6 non-HLA genes products. In: Simons, M.J., and Tait, B.D. (eds): Detection of immune-associated genetic markers of human disease. Churchill Livingstone 1984, pp. 52-64.
- 14.- Calin, A. (1984). Spondylarthropathies: An Overview. In: Calin, A. (ed): Spondylarthropathies. Grune and Stratton, Inc. 1984, pp. 1-8.
- 15.- Carroll, H.C., Campbell, R.D., and Porter, R.R. (1985). Mapping of steroid 21-hydroxylase genes adjacent to complement component C4 genes in HLA, the major histocompatibility complex in man. Proc Natl Acad Sci USA. 82: 521-525.
- 16.- Cresswell, P., Turner, M.J., Strominger, J.L. (1973). Papain-solubilized HL-A antigens from cultured human lymphocytes contain two peptide fragments. Proc Natl Acad Sci USA. 70: 1603-1607.
- 17.- David, J., and Douglas, F. (1985). The complement system. Sci Am Med. 6: 1-11.
- 18.- Dewald, G., and Rittner, Ch. (1979). Polymorphism of the second component (C2): Observation of the rare phenotype C2'2 (=C2B) and data on the localization of the C2 locus in the HLA region. Vox Sang 37: 47-54.
- 19.- De Wolf, W.-C., Schlossman, S.F., and Yunis, E.J. (1979). Drw antisera react with activated T cells. J Immunol. 122: 1780-1784.
- 20.- Eastmond, C.J., Willshaw, H.E., Burgess, S.E., et al. (1980). Frequency of faecal Klebsiella aerogenes in patients with ankylosing spondylitis and controls with respect to individual features of the disease. Ann Rheum Dis. 39: 118-123.

- 21.- Ebringer, R.W., Cawdell, D.R., Cowling, P., et al. (1978). Secuential studied in Ankylosing Spondylitis. Association of Klebsiella pneumoniae with active disease. *Ann Rheum Dis.* 37: 146-151.
- 22.- Fernández, H.N., and Hugly, T.E. (1977). Chemical evidence for common ancestry of complement components C3 and C5. *J Biol Chem.* 252: 1826-1830.
- 23.- Frank, N.M. (1987). Complement in the pathophysiology of human disease. *N Engl J Med.* 316(4): 1525-1530.
- 24.- Georg, F., and Colten, H.R. (1981). Biosynthesis of complement components. *Fed Proc.* 40(7): 2099-2104.
- 25.- Georgopoulos, K., Dick, C., Guodacre, J.A., and Pain, R.H. (1985). A reinvestigation of the cross-reactive between Klebsiella and HLA-B27 in the aetiology of Ankylosing Spondylitis. *Clin Exp Immunol.* 62: 662-671.
- 26.- Gigli, I., Von Zabern, I., and Porter, R. (1977). The isolation and structure of C4, the fourth component of human complement. *Biochem J.* 165: 439-446.
- 27.- Glass, D., Raum, D., Gibson, D., et al. (1976). Inherited deficiency of the second component of complement. *J Clin Invest.* 58: 853-861.
- 28.- Glass, D., Fearon, D.T., Austen, K.F. (1983). Inherited abnormalities of the complement system. In: *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, 5th edition. Stambury, B. (ed). Mc Graw-Hill, 1983, pp. 1934-1955.
- 29.- Goodfellow, P.N., Jones, E.A., Heyningen, V., et al. (1975). The beta 2- microglobulin gene is on chromosome 15 and not in the HL-A region. *Nature.* 254: 267-269.

- 30.- Gorodezky, C., Castro-Escobar, L.E., and Escobar-Gutiérrez, A. (1985). The HLA system in the prevalent Mexican Indian group: The Nahuas. *Tissue Antigens*. 25: 38-46.
- 31.- Gorsky, B.M.J., Rollini, P., Berte, C., et al. (1986). Polymorphism and regulation of HLA class II genes of the major histocompatibility complex. *Biology*. 51: 67-74.
- 32.- Granados-Arriola, J., Olivares-Prado, I., Melín-Aldana, H., Andrade, F., y col. (1986). Distinción de la población normal mexicana mediante marcadores genéticos. Importancia para el estudio de las enfermedades reumáticas. *Rev Mex Reum*. 1(5): 81-84.
- 33.- Granados, J., Melín-Aldana, H., Andrade, F., Vargas-Alarcón, G., Burgos-Vargas, R., and Alarcón-Segovia, D. (1988). Association between complement allele haplotypes (complotypes) and Juvenil Chronic Arthritis. (manuscrito en preparación).
- 34.- Green, J.R., Chiew, M., Low, H.C., and Weodrow, J.C. (1983). The association between HLA antigens and the presence of certain diseases statistics. *Med*. 2: 79-85.
- 35.- Grennan, D.M., and Dyer, P.A. (1988). Immunogenetics and rheumatoid arthritis. *Immunology today*. 9(2): 33-34.
- 36.- Haskins, K.R., Kubo, J., White, M., et al. (1983). The major histocompatibility complex-restricted antigen receptor in T cells. I-Isolation with a monoclonal antibody. *J Exp Med*. 157: 1149-1155.
- 37.- Hauptmann, G., Grosshans, E., et al. (1974). Lupus erythemateux aigus avec déficit héréditaires en complement. A propos d'un cas par déficit complet en C4. *Ann Dermatol Syphil*. 101: 479-496.
- 38.- Kahn, M.A., Kusher, I., and Braum, W.E. (1981). Association of HLA-A2 with uveitis in HLA-B27 positive patients with Ankylosing apondylitis *J Rheumatol*. 8: 295-298.

- 39.- Kaslow, R.A., Ryder, R.W., Calin, A. (1979). Search for Reiters syndrome after an outbreak of *Shigella sonnei* dysentery. *J Rheumatol.* 6: 562-566.
- 40.- Kerr, M.A., and Porter, R.R. (1978). *Biochem J.* 171: 99-107.
- 41.- Kimmo Aho, et al. (1985). Reactive Arthritis. In: Panayi, G.S. (Ed): *Clinics in Rheumatic Disease.* W.B. Saunders Company 1985 pp. 37.
- 42.- Kämpf, J., Bissbort, S., Gusaman, S. (1975). Polymorphism of red cells glyoxalase I (e.c.4.4.15). A new genetic marker in man. *Humangenetik* 27: 141-143.
- 43.- Lachmann, P.J. (1979). An evolutionary view of the complement system. *Behring Inst Mitt.* 63: 23-27.
- 44.- Lachmann, P.J. (1984). Inherited complement deficiencies. *Phil Trans R Soc Lond B306:* 419-430.
- 45.- Lachmann, P.J., and Hobart, M.J. (1978). Complement technology. In: Weir, D.M. (Ed). *Handbook of Experimental Immunology.* Blackwell Scientific, Oxford. Vol 1.
- 46.- Lambris, J.D., and Tsokos, G.C. (1986). The biology and pathophysiology of complement receptor. *Anticancer Res.* 6: 515-524.
- 47.- Maloy, W.L. (1987). Comparison of the primary structure of class I molecules. *Immunol Res.* 6: 11-29.
- 48.- Matheus, J.D. (1984). Statistical aspects of immunogenetics associations with disease. In: Simons, M.J., and Tait, B.D. (Eds). *Detection of immuneassociated genetic markers of human disease.* Churchill Livingstone, 1984. pp. 106-136.

- 49.- Mauff, G., Bender, K., and Fischer, B. (1979). Genetica polymorphism of the fourth component of human complement. *Vox Sang.* 34: 296-301.
- 50.- Mauff, G., Hauptmann, G., Daha, M., et al. (1980). Congenital inactivity of properdin factor B. Eight International Complement Workshop. *J Immunol.* 124: 1531 (Abstract).
- 51.- Meo, T., Atkinson, J.P., Bernoco, D., and Cappelini, R. (1977). Structural heterogeneity of C2 complement protein and its genetic variants in man: A new polymorphism of HLA region. *Proc Natl Acad Sci USA.* 74: 1672-1675.
- 52.- Meo, T., Atkinson, J.P., Bernoco, M., et al. (1976). Mapping of the HLA locus controlling C2 structural variants and linkage disequilibrium between alleles C2 and Bw15. *Eur J Immunol.* 6: 916-919.
- 53.- Medicus, R.G., Gotze, O., Muller-Eberhard, H.J. (1976). *Scand J Immunol.* 5: 1049-1055.
- 54.- Michael, C.C., and Alper, C.A (1987). Polymorphism and molecular genetics of human C4. *Br Med Bull.* 43(1): 50-65.
- 55.- Mollenhaver, E., Schmidt, R., Heinrichs, M., and Rittner, C. (1984).- Scleroderma: possible significance of silent alleles at the C4'B locus. *Arthritis Rheum.* 27: 711-712.
- 56.- Muller-Eberhard, H.J., and Biro, C.E. (1963). *J Exp Med.* 118: 447-466.
- 57.- Muller-Eberhard, H.J., Polley, M.J., and Calcott, M.A. (1967). Formation and functional significance of a molecular complex derived from the second and fourth component of human complement. *J Exp Med.* 125: 359-380.
- 58.- Nagasawua, S., and Stroud, R.B. (1977). *Fed Proc.* 36:1208-1212.

- 59.- Ngan, B., Minta, J.O. (1978). Analysis of the peptide maps of human factor B; evidence for structural homology and common ancestry. *J Immunol.* 120: 1978(Abstract).
- 60.- Olaisen, B., Teisberg, P., Nordhagen, R., et al. (1979). Human complement C4 locus is duplicated on same chromosome. *Nature.* 279: 736-739.
- 61.- O'Neill, G.J., Yang, S.Y., and Dupont, B. (1978). Two HLA-linked loci controlling the fourth component of human complement. *Proc Natl Acad Sci USA.* 75: 5165-5169.
- 62.- Pariser, K.M., Raum, D., Berkman, E.M., et al. (1978). Evidence for a silent or null gene in hereditary C2 deficiency. *J Immunol.* 121: 2580-2581.
- 63.- Raum, D., Donaldson, V.H., Rosen, F.S., and Alper, C.A. (1980). Genetic of complement. *Current Topics In Haematology.* pp. 111-174.
- 64.- Raum, D., Glass, D., Carpenter, C.B., et al. (1979). Mapping of the structural gene of the second component of complement with respect to the human major histocompatibility complex. *Am J Hum Genet.* 31: 35-41.
- 65.- Raum, D., Awdeh, Z.L., Yunis, E.J., et al. (1984). Extended major histocompatibility complex haplotypes in type I Diabetes Mellitus. *J Clin Invest.* 74: 44-454.
- 66.- Repo, H., Leirisalo-Repo, H. et al. (1984). Exaggerated inflammatory responsiveness plays a part in the pathogenesis of HLA-B27 linked disease-hypothesis. *Ann Clin Res.* 16: 47-50.
- 67.- Rittner, Ch., Hauptmann, G., Grosse-Wilde, E., et al. (1975). Linkage between HL-A (major histocompatibility complex) and genes controlling the synthesis of the fourth component of complement. In: Kissmeyer-Nielsen, F. (Ed). *Histocompatibility testing 1975*, Munksgaard, Copenhagen pp. 945-954.

- 68.- Rittner, Ch., and Bertrams, J. (1981). On the significance of C2, C4, and factor B polymorphism in disease. *Hum Genet.* 56:235-247.
- 69.- Russell, A.S., and Turc, J.M. (1985). Immunoglobulin allotypes in patients with ankylosing spondylitis, Reiters syndrome, and Acute Anterior Uveitis. *J Rheumatol.* 12: 523-525.
- 70.- Scholosstein, L., Terasaki, P.I. et al. (1973). High association of an HL-A antigens w27, with ankylosing spondylitis. *N Engl J Med.* 288: 704-706.
- 71.- Schrieber, R.D., and Muller-Eberhard, H.J. (1974). *J Exp Med.* 140:1324-1335.
- 72.- Shows, T.B, Alper, C.A., Bootman, D. et al. (1980). International system for human gene nomenclature. *Cytogenetic Cell Genet.* 25: 96-116.
- 73.- Silver, J., Ferrone, S. (1979). Structural polymorphism of human DR antigens. *Nature.* 279: 436-437.
- 74.- Snary, D., Barnstable, C.J., Rodmer, W.F. and Crumpton, M.J. (1977). Molecular structure of human histocompatibility antigens: The HLA-C series. *Eur J Immunol.* 7: 580-585.
- 75.- Snell, G.D. (1968). The H-2 locus of the mouse: Observations and speculations concerning its comparative genetics and its polymorphism. *Folia Biol.* 14: 335-358.
- 76.- Spies, T., Morton, C.C., Nedospasov, S.A., et al. (1986). Genes for the tumor necrosis factor alfa and beta are linked to the human major histocompatibility complex. *Proc Natl Acad Sci USA.* 83: 8699-8702.
- 77.- Stastny, P. (1977). Antigens in human monocytes I Ia antigens detected in monocytes using seventh workshop sera. In; Bodmer, W.F., Batchelor, J.R., Bodmer, J.G. (Eds). *Histocompatibility testing*, Munksgaard, Copenhagen, 1977. pp. 566-568.

- 78.- Stastny, P. (1978). Endothelial monocyte antigens in man. *Transplant Proc.* 10: 875-877.
- 79.- Stephen, C., Ross, M.D., and Peter, D. (1984). Complement deficiency states and interaction: Epidemiology, pathogenesis, and consequences of *Neisseria* and other infections in an immune deficiency. *Medicine.* 63(5): 243-273.
- 80.- Strachan, T. (1987). Molecular genetic and polymorphism of class I -- HLA antigens. *Br Med Bull.* 43(1): 1-14.
- 81.- Svejgaard, A., Jersild, L., Nielsen, S., Bodmer, F.W. (1974). HLA antigens and disease. Statistical and genetical considerations. *Tissue Antigens.* 4: 95-105.
- 82.- Tait, B.D., and Simons, M.J. (1984). Serological detection of HLA-A, B, C genes products. In: Simons, M.J., and Tait, B.D. (Eds). *Detection of Immune-associated genetic markers of human disease.* Churchill Livingstone, 1984. pp. 27-37.
- 83.- Tait, B.D., and Simons, M.J. (1984). Serological detection of HLA-D locus related (DR) gene products. In: Simons, M.J., and Tait, B.D. (Eds). *Detection of immune-associated genetic markers of human disease.* Churchill Livingstone, 1984. pp. 37-51.
- 84.- Tanigaki, N., Katagiri, M., Nakamuro, K., et al. (1974). Common antigenic structures of HL-A antigens in small fragments derived from papain HL-A antigen molecules. *Immunology.* 26: 155-168.
- 85.- Tanigaki, N., and Pressman, D. (1974). The basic structure and antigenic characteristics of HL-A antigen. *Transplant Rev.* 21: 15-34.
- 86.- Tiwari, J.L., and Terasaki, P.I. (1985). Psoriasis. In: Tiwari, J.L. and Terasaki, P.I. (Eds). *HLA and Disease Associations.* Springer-Verlag, N. Y. 1985.

- 87.- Urman, J.D., Zurier, R.B., and Rothfield, N.F. (1977). Reiters syndrome associated with *Campylobacter fetus* infection. *Ann Intern Med.* 86: 444-445.
- 88.- Weitkamp, L., and Francke, V. (1978). Report of the committee on the genetic constitution of chromosome 6. *Cytogenet Cell Genet.* 22: 92-105.
- 89.- Whitenead, A.S., Woods, D.E., Fleischnic, E. et al. (1984). DNA polymorphism of the C4 gene. A new marker for analysis of the major histocompatibility complex. *N Engl J Med.* 310: 80-91.
- 90.- Winchester, R.J., Fu, S.M., Wernet, P., et al. (1975). Recognition by pregnancy serums of non HL-A alloantigens selectively expressed on B-lymphocytes. *J Exp Med.* 141: 924-929.
- 91.- Woodrow, J.C. (1979). Genetics of B27-associated disease. *Ann Rheum Dis.* 38(Suppl): 135-141.
- 92.- Woodrow, J.C. (1977). Histocompatibility antigens and rheumatic disease. *Semin Arth Rheum.* 6: 257-276.
- 93.- Woods, D.E., Edge, M.D., and Colten, H.R. (1984). Isolation of a complementary DNA clone for the human complement protein C2 and its use in the identification of a restriction fragment length polymorphism. *J Clin Invest.* 74: 634-638.
- 94.- Zinlernagel, R.M., and Doherty, P.C. (1977). Major transplantation antigens, viruses, and specificity of surveillance T-cells: the "altered self" hypothesis. *Contemp Topics Immunobiol.* 7: 179-185.