

11261
2e3
1

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE MEDICINA CIUDAD UNIVERSITARIA

ESTUDIO INMUNOGENETICO EN MESTIZOS MEXICANOS
CON ARTRITIS REUMATOIDE

T E S I S

que para obtener el titulo de

MAESTRA EN CIENCIAS BIOMEDICAS (INMUNOLOGIA)

Presenta

L U Z M A B E L A V I L A P O R T I L L O

Director tesis: DR. Julio Granados Arriola

MEXICO DF, CIUDAD UNIVERSITARIA

1989

CALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE GENERAL

	Pags
RESUMEN	i
ANTECEDENTES	1
-ARTRITIS REUMATOIDE	1
-SISTEMA PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD	6
-INMUNOGENETICA DE LA ARTRITIS REUMATOIDE	20
OBJETIVOS	26
MATERIAL Y METODOS	27
-MUESTRA	28
-TIPIFICACION MOLECULAS CLASE I Y II	28
-TIPIFICACION MOLECULAS CLASE III	37
-ANALISIS ESTADISTICO	49
RESULTADOS	52
DISCUSION	60
CONCLUSIONES	66
BIBLIOGRAFIA	67

INDICE DE FIGURAS

FIGURA	TITULO
1	ETIOLOGIA DE LA ARTRITIS REUMATOIDE
2	MECANISMOS PATOGENICOS DE LA ARTRITIS REUMATOIDE
3	SISTEMA PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD
4	ESTRUCTURA MOLECULAS CLASE I Y II
5	ORGANIZACION GENETICA MOLECULAS CLASE II
6	ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE LA MOLECULA CLASE II
7	ARBOL GENEALOGICO PARA DEMOSTRAR HERENCIA
8	PATRON ELECTROFORETICO DE FB
9	PATRON ELECTROFORETICO DE C4
10	PATRON ELECTROFORETICO DE C2
11-35	ARBOLES GENEALOGICOS DE LAS FAMILIAS
36	FRECUENCIA DE ANTIGENOS HLA-A EN PTES., FLIARES., NORMALES
37	FRECUENCIA DE ANTIGENOS HLA-B EN PTES., FLIARES., NORMALES
38	FRECUENCIA DE ANTIGENOS HLA-DR EN PTES., FLIARES. NORMALES
39	FRECUENCIA DE COMLOTIPOS EN PTES., FLIARES., NORMALES
40	FENOTIPOS DR DE LOS PACIENTES(A) Y FAMILIARES (B)

INDICE DE CUADROS

CUADRO	TITULO
1	LISTA OFICIAL DE ESPECIFICIDADES HLA 1987
2	DESEQUILIBRIO DE LIGAMIENTO EN MOLECULAS CLASE II
3	POLIMORFISMO DE LOS FACTORES DEL COMPLEMENTO
4	ENFERMEDADES ASOCIADAS A HLA
5	HLA-DR4 Y ARTRITIS REUMATOIDE
6	SUBTIPOS DE HLA-DR4 EN CULTIVO MIXTO DE LINFOCITOS
7	DIFERENCIAS EN LA SECUENCIA DE AA' EN EL PRIMER DOMINIO DE LA CADENA DQ BETA DE LA REGION DQ
8	HAPLOTIPOS AFECTADOS POR AR
9	HAPLOTIPOS AEECTADOS POR AR
10	HAPLOTIPOS FAMILIARES NO AFECTADOS POR AR
11	HAPLOTIPOS CONTROL
12	HAPLOTIPOS CONTROL
13	X Y SIGNIFICANCIA ESTADISTICA DE LOS ANTIGENOS ESTUDIADOS
14	LISTA DE LOS HAPLOTIPOS DE LOS PACIENTES EN BASE A LOS HLA-DR MAS FRECUENTES
15	TEORIA DE LA EPTOPE COMPARTIDA

ESTUDIO INMUNOGENETICO EN MESTIZOS MEXICANOS CON ARTRITIS REUMATOIDE AR

La etiopatogenia de la AR es multifactorial. Y entre esos factores estan los genéticos. De los genes, han sido útiles los del MHC. El estudio de ellos ha demostrado asociación entre el HLA-DR4 y AR en la mayoría de las poblaciones hasta ahora estudiadas. Dado que la frecuencia de DR4 es alta en la población mexicana el objetivo de este estudio fue conocer si los pacientes mexicanos con AR son portadores del alelo en cuestion y/o si tienen otros marcadores conjunta o aisladamente. Se estudiaron 25 familias que incluyeron: 29 pacientes con AR así como 88 parientes en primer grado. El diseño es transversal, observacional y analítico descriptivo. Se tipificaron los antígenos del MHC clase I (Loci A y B) y los clase II (Loci DR y DQ) mediante microlinfotoxicidad; los clase III (FB, C4A y C4B) por electroforesis en gel de agarosa e inmunofijación y electroenfoque en gel de poliacrilamida y ensayo hemolítico para C2. Con los fenotipos obtenidos se construyeron los haplotipos (1 por cromosoma, 2 por persona). y se compararon los pacientes con los familiares. El análisis estadístico se hizo por Ji cuadrada y Fischer, a los antígenos significativos se les realizó el RR y las familias fueron analizadas de forma descriptiva.

-6

Los resultados mostraron aumento de A1 y B8 ($P < 10^{-6}$, $P < 0.025$) en los pacientes, estos antígenos se conoce que son raros en la población mexicana, el DR3 se encontro aumentado de manera significativa ($P < 0.025$ RR 4.3). El DR4 se encontró incrementado en los ptes Vs familiares ($P < 0.05$), en los controles se noto una

frecuencia mas baja de DR4 que en los pacientes pero estadisticamente no fue significativa, probablemente debido a que este antígeno es muy frecuente en nuestra población, los datos sugieren la participación de subtipos de DR4 diferentes en los pacientes comparado con los de los controles. Respecto a las moléculas clase III el alelo DR*F se encontro incrementado en los pacientes vs controles ($P < 10^{-6}$), este alelo se encontró formando parte de los genotipos FC31 y FC30; los alelos nulos en C4A (C4AQ*) fueron muy frecuentes en los tres grupos pero se encontraron significativamente aumentados en los pacientes ($P < 0.05$). Por último cabe señalar que la variabilidad en estos resultados evidencia la etiología multifactorial y la participación del medio ambiente como un factor muy importante en la génesis de AR.

ARTRITIS REUMATOIDE

DEFINICION:

La artritis reumatoide AR es una enfermedad crónica difusa del tejido conjuntivo caracterizada primordialmente por inflamación articular y en ocasiones manifestaciones multisistémicas, de etiología desconocida en la que interactúan factores genéticos, ambientales, hormonales e inmunológicos(80). La inflamación articular generalmente produce una destrucción progresiva de la articulación, deformidades y grados variables de incapacidad. Las manifestaciones extrarticulares incluyen vasculitis, nódulos subcutaneos, episcleritis, neuropatía, pericarditis, linfadenopatía y esplenomegalia (54).

EPIDEMIOLOGIA

La distribución de la enfermedad es a nivel mundial e involucra todos los grupos étnicos y raciales. La prevalencia varía desde 0.0026% a 1.5% (54) , las mujeres son afectadas dos a tres veces más que los hombres, el pico de incidencia de la edad de la enfermedad es entre la cuarta y sexta década de la vida (80).

ETIOLOGIA

En la actualidad se considera como una enfermedad de etiología multifactorial; es decir, que puede resultar de la interacción del medio ambiente con un huésped genéticamente susceptible (77). Figura #1.

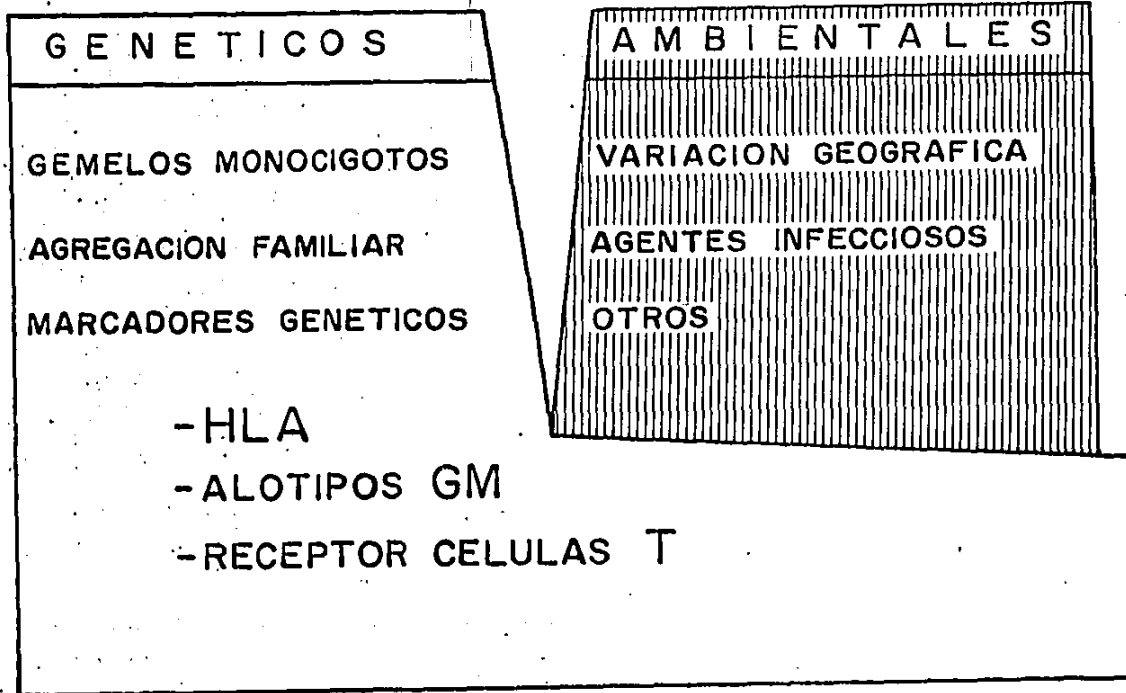
Existen evidencias de la participación ambiental como se demostró en una población rural de Surafrica (Venda) en la que se encontró una muy baja prevalencia (0.0026%) de la enfermedad comparada con la de la población urbanizada africana (1%) observándose en ellas características genéticas semejantes (12). Por otra parte, en Lesotho una población situada fuera de la zona tropical la prevalencia fue de 1% y la gravedad de la enfermedad fue mayor comparada con la zona tropical (12).

El papel de la infección crónica no es claro, sin embargo las hipótesis sustentadas en modelos animales sugieren a los agentes infecciosos como posibles responsables de ciertas artropatías semejantes a AR, entre estos se citan a: bacterias como *Erysipelothrix insidiosa*, *Streptococcus agalactiae*, al *mycoplasma arthritidis*, al más renombrado recientemente el virus de Epstein Barr y otros. (46)

Se han considerado factores inductores endógenos, al inyectar colágeno tipo II en ratas se produce una enfermedad semejante a

FIGURA 1

SUSCEPTIBILIDAD ARTRITIS REUMATOIDE
18030



AR. Lo anterior hace suponer que el elemento predisponente no es siempre el mismo y que varios factores pueden desencadenar el padecimiento en un huésped genéticamente predispuesto.

La participación genética fue sugerida inicialmente por la concordancia 6 veces mayor en gemelos monocigotos que en (34%) dicigotos (5-7%) (54), por la agregación familiar (31%), posteriormente Statsny encontró asociación significativa de AR con HLA-Dw4. (63).

PATOGENESIS

La inflamación articular es mediada primariamente por leucocitos PMN y sus productos. Participan células inflamatorias crónicas (linfocitos y macrófagos) que infiltran la sinovial y producen factores solubles que inducen inflamación y destrucción del tejido sinovial. Los cambios tempranos en la AR se caracterizan por daño al endotelio de la microvasculatura, infiltración de células inflamatorias, depósito de fibrina en la sinovial, existe además, un incremento en el número de células pero los linfocitos y las células plasmáticas están ausentes, progresivamente hay un aumento de la microvasculatura con células inflamatorias y presencia de trombos. La infiltración masiva y proliferación de la sinovial erosiona el cartilago, hueso, y puede afectarse concomitantemente ligamentos y tendones. Los linfocitos que se observan primariamente son CD4 y están en

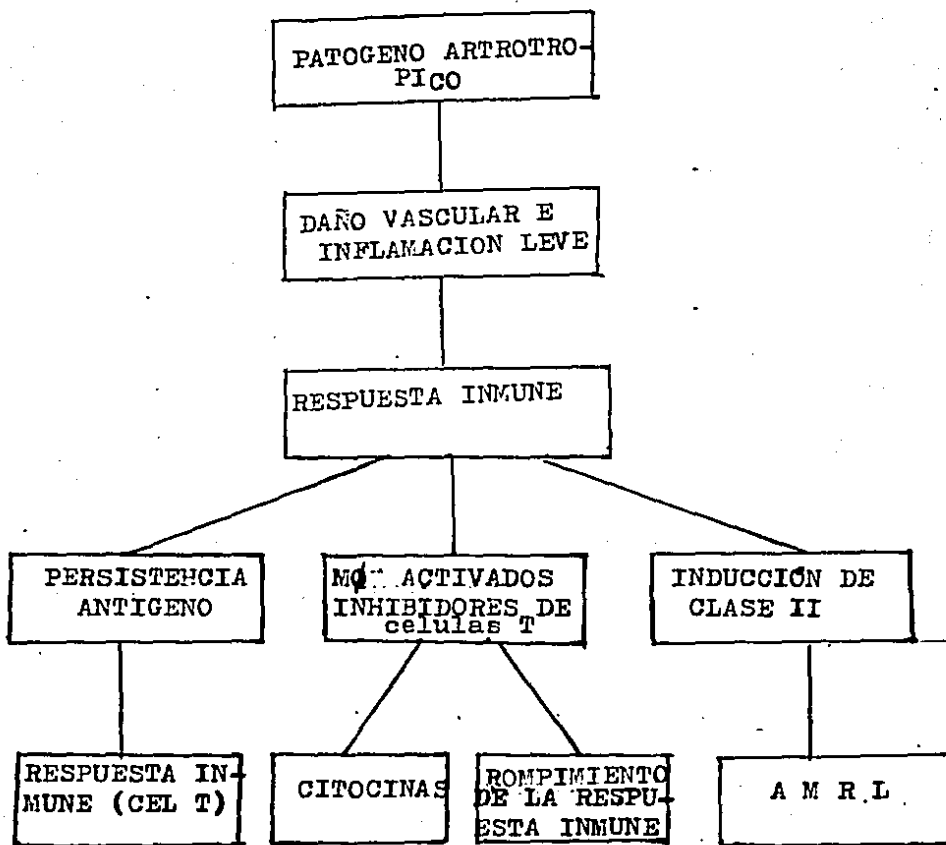
proximidad a macrófagos que expresan molécula clase II (24).

Los anticuerpos producidos localmente dirigidos contra la porción Fc de la IgG forman complejos inmunes IgG-AntiIgG que activan el complemento causando niveles bajos de complemento en el líquido sinovial, incrementando la permeabilidad vascular y acumulación de leucocitos PMN que atraídos por factores quimiotácticos del complemento, liberan enzimas hidrolíticas, radicales de oxígeno, metabolitos de ácido araquidónico que son responsables de la inflamación y el daño tisular . En el tejido articular, se encuentran anticuerpos contra colágeno, fibrina, IgG parcialmente digerida, DNA y nucleoproteínas solubles (15). Una de las interrogantes acerca de la enfermedad es cómo y por qué una respuesta inmune normal en el estado agudo progresa a inflamación crónica. Aun cuando se supone que el agente etiológico inicial puede o no persistir en la articulación, la lesión puede perpetuarse a través del tiempo por diferentes eventos resultantes de la inflamación misma. A continuación se presentan tres modelos propuestos en la patogénesis de la AR (figura #2):

1. Respuesta inmune manejada por células T

El proceso inicia cuando un antígeno artrotrópico llega a la articulación . Este es desconocido pero puede ser un virus incluido en macrófagos ó linfocitos , productos no biodegradables de las bacterias, anticuerpos dirigidos contra estructuras articulares que inician una respuesta inflamatoria mediada por células T dirigidas contra el antígeno patógeno persistente(73).

GRAFICA 2



REPRESENTACION GRAFICA DE VARIAS VIAS QUE PUEDEN ESTAR INVOLUCRADAS EN LA PERPETUACION DE A R

Una de las evidencias que sustentan esta hipótesis puede ser: la artritis de Lyme que semeja AR y es producida por espiroquetas (46). Con la fase de activación se hacen aparentes moléculas Ia, por otro lado, los linfocitos asociados a estas células accesorias, producen otras linfocinas que aunadas a factores solubles derivados de los macrófagos inducen proliferación sinovial, y crecimiento y diferenciación de linfocitos B a células productoras de anticuerpos (24).

2. Células T autoreactivas:

La lesión reumatoide puede perpetuarse en ausencia del agente desencadenante por una respuesta a antígenos diferentes a los incitadores del proceso (24).

3. Células sinoviales transformadas

La sinovitis puede ser producida por interacción de macrófagos y fibroblastos sinoviales que se encuentran limitando la articulación, los mediadores resultantes de tal interacción inducen a otros macrófagos a expresar mayor proporción de moléculas Ia, otras células activadas en la periferia penetran a la articulación y estimulan a fibroblastos sinoviales adyacentes a proliferar y secretar enzimas y otros amplificadores de la inflamación como las prostaglandinas (80).

SISTEMA PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD

La regulación del sistema inmune es compleja, y en ella participan moléculas codificadas por genes, algunas de las cuales son halladas dentro de un complejo llamado sistema principal de histocompatibilidad (MHC) (figura# 3). En los humanos estos genes están localizados en el brazo corto del cromosoma 6 (6p21), y son conocidos como sistema HLA. En el ratón este complejo está en el cromosoma 17 y es llamado complejo H-2. Gorer en 1938 definió el complejo en el ratón(), y a partir de entonces se conoció el papel biológico de estas moléculas y se inició el estudio en el humano. Dausset demostró isoanticuerpos en individuos que habían recibido transfusión sanguínea , Payne y Van Rood 1958, demostraron que los sueros de mujeres multiparas tenían anticuerpos contra estas moléculas, Terasaki estableció una técnica de microlinfotoxicidad, la cual permite reconocer a los antígenos HLA mediante la reacción Ag-Ac entre las células y los antisueros específicos().

El MHC está constituido por tres tipos de moléculas, las clase I y clase II pertenecen al sistema HLA y las clase III pertenecen al sistema del complemento().

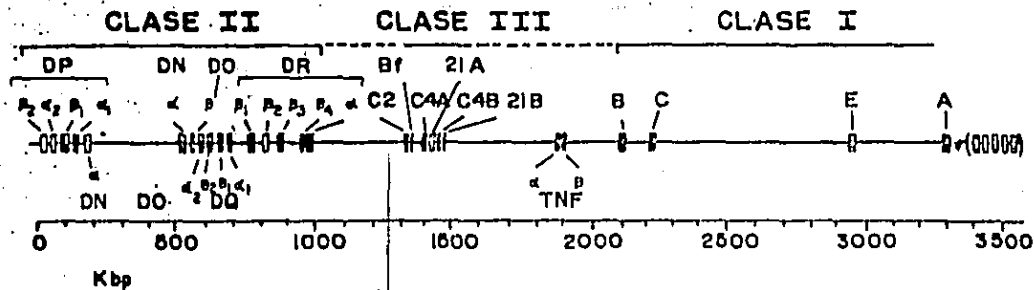


Figura # 3: Mapa del MHC en el brazo corto del cromosoma 6 humano, donde se muestra la ubicación de los genes para las moléculas clase I, II, y III, el factor de necrosis tumoral, y los genes 21-OHA y 21-OHB (22)

▨ Expresion? ▩ gen. □ pseudogen

La región de los clase I está constituida por tres loci que codifican los antígenos HLA-A, B, C ; estos antígenos se localizan en la membrana de la mayoría de las células nucleadas y regulan la respuesta de las células CD8 (T citotóxicas) en contra de los virus. Estas células CD8 funcionan reconociendo los determinantes antígenicos en asociación con los antígenos clase I.

Los genes clase II están constituidos por los loci HLA-DR, DQ, DP y otros loci (DZ, DO) no precisados. Se encuentran solo en ciertos tipos de células (M0, linfocitos B, linfocitos T activados,) y tienen un papel crucial en el reconocimiento del antígeno y en éste caso se efectúa por las células CD4 (T cooperadora). Los determinantes antígenicos de los organismos extraños se sitúan en la membrana de la célula presentadora del antígeno asociado a las moléculas clase II; este complejo es reconocido por el receptor de las células CD4).

Los genes clase III codifican para la estructura primaria de las proteínas del complemento C2, Factor B, C4A y C4B e interpuestos entre los dos genes de C4 están los genes A y B para la enzima 21-Hidroxilasa.

Todo este sistema ocupa una pequeña porción del cromosoma 6 (2cM) Por ésto, el grado de recombinación genética es muy bajo (< 2%) de aquí resulta que este complejo se considera como una unidad genética y por lo tanto estos genes llamados haplotipos se heredan en grupo a la descendencia. Los productos de estos

genes se transmiten en forma mendeliana codominante y por lo tanto cada uno de los hijos expresa siempre dos antígenos específicos (alelos) de cada locus del HLA. Para conocer los haplotipos de los pacientes en la mayoría de las veces es necesario estudiar a la familia nuclear, dado que lo que determinamos es el fenotipo de los individuos. Por ejemplo, si un paciente es A1,A2, B8, DR3, DR4; solo estudiando a los padres podemos deducir sus haplotipos (genotipos) figura # 41.

POLIMORFISMO DEL HLA

El HLA es el sistema genético más polimórfico del ser humano. Actualmente se han descrito 157 antígenos en total de los cuales el locus A: 24, B: 52, C:11, D:26, DR:20, DQ:9 , DP:6, FB:4, C2:4 C4A:7 y C4B:8 (cuadro #1). Se desconoce el mecanismo que dio lugar a este polimorfismo pero hay dos hipótesis que tratan de explicarlo; "Hipótesis de deriva aleatoria" la cual explica que el polimorfismo se debe a las variaciones al azar de una estructura genética básica y que esta variación tiene una cierta frecuencia dentro de una población determinada. La otra "Hipótesis de selección natural" propone que existe selección de genes polimórficos sobre los que son monomórficos. Probablemente los dos procesos mencionados participan en el desarrollo del polimorfismo que caracteriza a los genes del MHC.

CUADRO # 1 LISTA OFICIAL DE ESPECIFICIDADES HLA 1987 (22)

A	B	C	D	DR	DP	DQ
A1	B5	Cw1	Dw1	DR1	DPw1	DQw1
A2	B7	Cw2	Dw2	DR2	DPw2	DQw2
A3	B8	Cw3	Dw3	DR3	DPw3	DQw3
A9	B12	Cw4	Dw4	DR4	DPw4	DQw4
A10	B13	Cw5	Dw5	DR5	DPw5	DQw5(w1)
A11	B14	Cw6	Dw6	DR6	DPw6	DQw6(w1)
Aw19	B15	Cw7	Dw7	DR7		DQw7(w3)
Aw23(9)	B16	Cw8	Dw8	DRw8		DQw8(w3)
Aw24(9)	B17	Cw9(w3)	Dw9	DR9		DQw9(w3)
Aw25(10)	B18	Cw10(w3)	Dw10	DRw10		
Aw26(10)	B21	Cw11	Dw11(w7)	DRw11(5)		
A28	Bw22		Dw12	DRw12(5)		
A29(19)	B27		Dw13	DRw13(w6)		
A30(19)	B35		Dw14	DRw14(w6)		
Aw31(19)	B37		Dw15	DRw15(2)		
A32(w19)	B38(16)		Dw16	DRw16(2)		
A33(w19)	B39(16)		Dw17(w7)	DRw17(3)		
A34(10)	B40		Dw18(w6)	DRw18(3)		
Aw36	Bw41		Dw19(w6)	DRw52		
Aw43	Bw42		Dw20	DRw53		
Aw66(10)	B44(12)		Dw21			
Aw68(28)	B45(12)		Dw22			
Aw69(28)	Bw46		Dw23			
Aw74(19)	Bw47		Dw24			
	Bw48		Dw25			
	B49(21)		Dw26			
	Bw50(21)					
	B51(5)					
	Bw52(5)					
	Bw53					
	Bw54(w22)					
	Bw55(w22)					
	Bw56(w22)					
	Bw57(17)					
	Bw58(17)					
	Bw59					
	Bw60(40)					
	Bw61(40)					
	Bw62(15)					
	Bw63(15)					
	Bw64(14)					
	Bw65(14)					
	Bw67					
	Bw71(w70)					
	Bw72(w70)					
	Bw70					
	Bw73					
	Bw75(15)					
	Bw76(15)					
	Bw77(15)					
	Bw6					
	Bw6					

DESEQUILIBRIO GENETICO DE LIGAMENTO:

Los antígenos del sistema HLA varían de una población a otra, por ejemplo, el antígeno HLA-A30 se encuentra predominantemente en individuos negros 28%, en blancos solo es de 5%, en japoneses no se ha descrito este antígeno.

La frecuencia de haplotipos también varía de una población a otra, en individuos de raza blanca es frecuente el haplotipo: HLA-A1, B8, DR3, Dw3, SC01. Esto es debido a que en ocasiones los alelos de dos o más loci aparecen juntos en el mismo cromosoma con una frecuencia mayor a lo que se esperaría si se combinasen al azar. Este fenómeno se conoce como "desequilibrio genético de ligamiento" por ejemplo el haplotipo HLA-A1, B8 existe en la población normal caucásica con una frecuencia de 6.8% cuando que su frecuencia esperada (según la frecuencia génica de A1 y de B8) es de 1.7%.

FUNCION DE LAS MOLECULAS HLA

Los linfocitos T están involucrados en casi todos los aspectos de la respuesta inmunológica. Estos funcionan en la producción de anticuerpos específicos a macromoléculas extrañas, eliminación de células infectadas por virus y en mantener tolerancia inmunológica a lo propio. En contraste a las células B que usan inmunoglobulinas en su superficie como receptor, las

celulas T tienen expresia clonal, sin embargo en contraste a las inmunoglobulinas , las cuales pueden ligar independientemente antigenos proteicos intactos, el receptor de la celula T solamente interactua con peptidos cortos que estan ligados por moleculas clase I o clase II del sistema principal de histocompatibilidad. Tales fragmentos son producidos por degraación intracélular o procesamiento de virus, bacterias o proteinas extrañas. El HLA con el peptido ligado presenta este antigeno al receptor de la célula T, las clase I presentan antigenos a células CD8+ y las clase II presentan antigenos usualmente a las celulas cooperadoras que expresan CD4 . Es posible que diferencias polimórficas sirven para alterar la especificidad para unir el peptido y la interacción con el receptor de la célula T, esto a su vez puede resultar en diferencias en la respuesta inmunologica, susceptibilidad y resistencia a enfermedades y en aloantigenicidad().

BIOQUIMICA DEL HLA:

La función básica de las moleculas clase I y II del MHC con respecto a la respuesta inmune es la de actuar como marcadores o guias para la identidad individual ().

MOLECULAS CLASE I

Tambien son llamadas antígenos de transplante por que se descubrierón como resultado de estudios de rechazo de tejidos tanto en ratones como en humanos. Cada una de las moléculas clase I esta compuesta de una cadena pesada alfa que es una glicoproteína de 45 KD codificada en el cromosoma 6 y una cadena ligera llamada Beta 2 microglobulina de 13 KD que es codificada en el cromosoma 15. Estas 2 moléculas forman un heterodimero en la membrana celular y estan unidas por enlaces no covalentes (figura #4).

Las moléculas clase I estan conformadas en 5 dominios, tres de ellos (Alfa I, Alfa II y Alfa III) que contienen 90 residuos de aminoácidos y estan situados en la parte exterior de la célula. Los dominios Alfa 2 y Alfa 3 tienen puente disulfuro dispuestos de manera similar a como se encuentran en la molécula de inmunoglobulina. El cuarto dominio tiene 40 residuos hidrofóficicos y esta situado dentro de la membrana celular. El quinto dominio contiene 30 residuos de longitud y esta proyectado dentro del citoplasma. Los dominios estan doblados de tal forma que el Alfa 1 y Alfa 2 se unen por fuerzas no covalentes y de igual manera estan unidos el Alfa 3 y la Beta 2 micrologulina ().

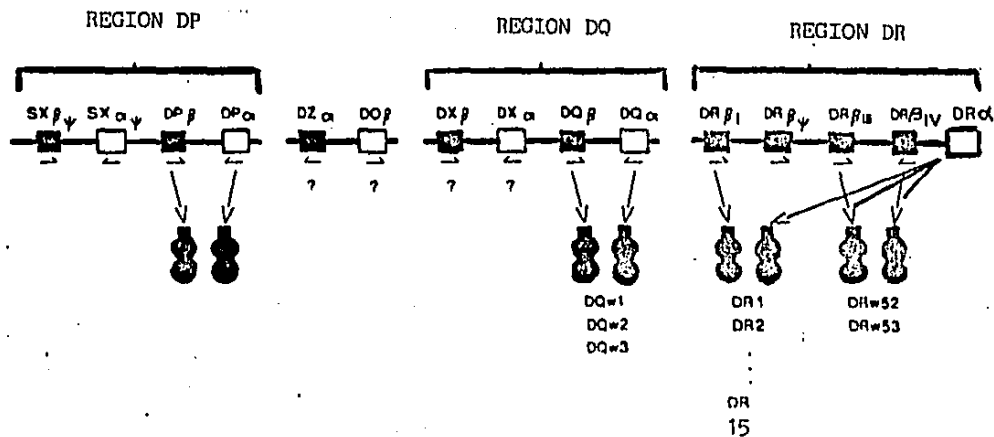
MOLECULAS CLASE II

La región clase II esta compuesta por alrededor de 1 millón de pares de bases e incluye alrededor de 14 genes diferentes, con excepción de DQ y DZ. Estos genes son generalmente hallados en tres regiones DR, DQ o DP. Cada subregión tiene al menos 1 gen funcional para Alfa y Beta, además un número variable de pseudogenes no funcionales. Los productos de esta región se asocian de manera no covalente como heterodimeros en la membrana celular (Figura#5) y son una cadena alfa de 30 KD y una cadena Beta de 27 KD. Cada cadena polipeptídica esta compuesta de dos dominios (Alfa 1 y Alfa 2, Beta 1 y Beta 2); las regiones de cada uno de estos dominios tiene 90 aminoácidos. Existe otro dominio el cual atravieza la membrana y tiene 30 aminoácidos. El último dominio solo tiene 15 residuos y constituye el dominio intracitoplasmático. De las cuatro regiones externas, tres de ellas (Alfa 2, Beta1 y Beta2) poseen uniones disulfuro tambien de manera similar a la encontrada en las inmunoglobulinas ().

La subregión DR contiene 3 cadenas beta funcionales designadas como DRBI, DRBIII, DRBIV, estas cadenas son polimórficas. La DRBI codifica para las especificidades DR (1-23) La DRBIII para DR w52 y la DRBIV para DR w53. En la región DQ las dos cadenas son polimórficas y codifican para el DQ 1-8. Los genes dentro de las regiones DR y DQ estan muy unidos y se heredan como una unidad genética formando haplotipos estables dentro de la población ejemplo de ellos: DR4, DQw3, DRw53. y otros (cuadro#2)

FIGURA 5

ORGANIZACION GENETICA DE LAS MOLECULAS CLASE II
DEL SISTEMA PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD



Gregersen PK, et al, 1987

cuadro 2

DESEQUILIBRIO DE LIGAMENTO EN
LA MOLECULA CLASE II (DR-DQ)

DRw13 (DRw6) DRw14 (DRw6)	DR1 DR2 DRw10	DQW1
DR3	DR7	DQW2
DRw11 (DR5) DRw12 (DR5)	DR4 DRw9	DQW3
DRw8		
DRw52	DRw53	

Las subclases individuales de la molecula clase II se expresan a diferentes niveles, en algunas células, tales como una subpoblación de macrófagos , presentan solamente DR otras tales como los linfocitos B tienen las tres subclases, y aun cuando todas se expresan, estas tienen diferentes niveles de expresión: las moleculase DR Alfa-Beta I son mas abundantes que las DR Alfa-Beta III y DR Alfa-Beta IV, mientras el DR es expresado mas que DQ ó DP, sin embargo estas tienen una limitada distribución en los tejidos y se encuentran predominantemente sobre células inmunocompetentes, incluyendo células B, células T inmunocompetentes y macrófagos. La expresión de las moleculas clase II puede ser inducida sobre células B con Interleucina-4, sobre células T por contacto con antígenos específicos y sobre macrófagos por interferon gama. Además las moleculas clase II pueden expresarse sobre otras células que normalmente no las manifiestan tales como células tiroideas, células pancreáticas, células renales, endotelio vascular. Esta expresión aberrante ha sido postulada a ser uno de los mecanismos para entender la asociación de antígenos clase II y enfermedad. La regulación de la expresión de los genes clase II es manejada por la interacción de factores específicos de tejido con una serie de elementos regulatorios que actúan en posición Cis, y que están localizados adyacentes a los genes de la porción clase II ().

MOLECULAS CLASE III:

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). teniendo la característica de que el gen que codifica para C4 se encuentra duplicado (C4A y C4B), interpuesto entre estos se encuentra dos genes para la 21 OH importante en la biosíntesis de esteroides. Todos ellos ocupan una región de aproximadamente 120 kilobases (Kb) del brazo corto del cromosoma 6 humano; son denominados complotipos y se sitúan entre los genes clase II y clase I. 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. Los loci del complemento son también muy polimórficos como se observa en el cuadro #3.

CUADRO 3 POLIMORFISMO DE LOS GENES QUE CODIFICAN PARA LAS MOLECULAS DEL COMPLEMENTO: fb, C2, C4A y C4B ()

fb	C2	C4A	C4B
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

CUARTO COMPONENTE DEL COMPLEMENTO C4

El C4 es una glicoproteína cuya estructura fue caracterizada en 1963 como una B1-globulina con un peso aproximado de 200.000 d. En 1969, Rosenfeld y col. 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, en 1974, Schreiber y Muller demostraron que C4 esta compuesto de 3 subunidades unidas por puentes disulfuro, la alfa, beta y la gama de pesos de 98.000, 78.000 y 33.000 d. respectivamente. En 1979 Olaisen y col. usando estudios de absorción mostraron que el locus de C4 se encuentra por duplicado, por otro lado Mauff y col. en 1978 usando un sistema de amortiguador discontinuo e inmunofijación, establecieron la presencia de un patrón de 6 a 8 bandas para C4. En 1979 Awdeh y Alper introdujeron el proceso de desialación con neuraminidasa antes de la electroforesis en gel de agarosa e inmunofijación. 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 en general. pero los individuos totalmente deficientes de C4 ocurren de 1:1000 individuos. Los productos comunes de C4A migran mas anódicamente que los productos de C4B pero existen considerables diferencias en la zona de migración de las variantes raras de ambos loci.

SEGUNDO COMPONENTE DEL COMPLEMENTO C2

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), es vulnerable a la proteólisis durante su obtención. 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 es una proteasa con el sitio catalítico en la cadena más pesada.

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. El alotipo más común es C2C con una frecuencia del 95% en la población caucasica, el C2B tiene una frecuencia del 4-5% y por último, existe una variante ácida que es sumamente rara y cuya frecuencia es menor al 1% C2A. El C2 se hereda en forma autosómica dominante y su polimorfismo fue establecido por electroenfoque().

FACTOR B

Para determinar el polimorfismo genético 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 quien obtuvo 4 bandas diferentes que fueron llamadas según su desplazamiento electroforético FB*F (por Fast= rapido), FB*S (por Slow = lento), FB*F1 por que su posición electroforética está mas hacia el anodo 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. 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 no es funcional ().

ASOCIACION CON ENFERMEDADES

Los avances ocurridos en el conocimiento de la genética y la biología de las moléculas clase I, II y III han estimulado la investigación en el área de la asociación de enfermedades con alelos de estos genes, especialmente por el papel que tienen en la regulación de la respuesta inmune. De aquí se infiere que cualquier trastorno ya sea como aumento o defecto de la respuesta inmune, es natural que involucre a cualquiera de los antígenos del MHC teniendo por lo tanto consecuencias relevantes en el tipo de respuesta inmune desarrollada por un individuo en particular. La asociación con enfermedades se demostró primero en ratones de la cepa H2 y un tipo de leucemia inducida por virus (). Esta asociación de marcador genético con una enfermedad indujo entonces a buscar asociaciones entre los fenotipos HLA y las enfermedades en humanos.

En 1973 se reportó la asociación entre espondilitis anquilosante y el antígeno HLA-B27. Desde entonces mas de 50

enfermedades han sido reportadas asociadas con antígenos del sistema HLA (). Estas enfermedades se pueden clasificar de dos tipos: 1. Espondiloartropatías asociadas a HLA-B27

2. Enfermedades asociadas con varios antígenos de el locus DR.

En esta última categoría casi todas las enfermedades son de origen autoinmune, involucrando la producción de autoanticuerpos dirigidos contra antígenos tisulares propios. Las enfermedades asociadas con los antígenos HLA son de carácter multifactorial y por lo mismo incluyen tanto el terreno genético del individuo (susceptibilidad) como también ciertos factores ambientales, actuando conjuntamente estos dos factores para producir enfermedad específica. Se han propuesto varios mecanismos para explicar el papel de los alelos del MHC en el establecimiento de la susceptibilidad a enfermedades()::

1. Mimetismo molecular: la cual explica la susceptibilidad mediante reacción cruzada entre organismos infecciosos y una antígeno del sistema HLA determinado.
2. Receptor: establece que ciertos antígenos HLA pueden actuar como receptores específicos para agentes infecciosos y que este evento esta directamente relacionado con el desarrollo de la enfermedad.
3. Antígeno HLA modificado: sugiere que los antígenos HLA estan modificados químicamente por antígenos extraños y entonces el sistema inmune los reconoce como no propios, respondiendo por lo tanto a la producción de el autoanticuerpo correspondiente, generandose así el estado de enfermedad.

4. Gen en desequilibrio con HLA: Un gen de susceptibilidad situado dentro o fuera del HLA en desequilibrio con un antígeno de este sistema.

Ninguna hipótesis en forma aislada explica todas las asociaciones que se han registrado y bien pudiera ser que cada uno de estos mecanismos propuestos este involucrado ya sea en uno o varios de los procesos de enfermedad asociados con MHC.

En el cuadro #4 se observan algunas de las enfermedades mas fuertemente asociadas al MHC.

ENFERMEDADES ASOCIADAS A HLA

CUADRO 4

ARTRITIS REUMATOIDE	DR4
LUPUS ERITEMATOSO GENERALIZADO	DR3
ESPONDILITIS ANQUILOSANTE	B27
SINDROME DE REITER	B27
UVEITIS ANTERIOR AGUDA	B27
ENFERMEDAD CELIACA	DR3
DEFICIENCIA DE IG A	B8
DIABETES INSULINO-DEPENDIENTE TIPO I.	DR3/DR4
PSORIASIS	Cw6

INMUNOGENETICA DE LA ARTRITIS REUMATOIDE

El papel de los antígenos de el MHC en el desarrollo de la AR no es claro pero existe gran asociación entre genotipos HLA específicos y la susceptibilidad a la enfermedad. Las proteínas codificadas por los genes de HLA participan en el reconocimiento y regulación de la respuesta inmune. Estas juegan un papel crucial en el reconocimiento de antígenos extraños por la célula cooperadora T, la cual regula la respuesta inmune mediada por células(). Los mecanismos exactos de este reconocimiento, no han sido bien dilucidados, pero varios investigadores, han demostrado que el reconocimiento de las célula T a Ags extraños en conjunción con la molécula propia-HLA es altamente específico y que estas células pueden distinguir cambios tan pequeños como el de una sustitución de aminoácidos en la molécula de MHC ().

Numerosos estudios han encontrado una asociación significativa entre HLA-DR4 en alrededor de 70% de los pacientes con AR. Esta asociación cruza barreras raciales como lo demuestra el cuadro #5 en el que en diferentes grupos étnicos se observa un riesgo relativo (RR) para este antígeno que varía desde 2.8 en orientales hasta 5.4 en negros. En estudios realizados en India e Israel (,) el HLA-DR1 estuvo incrementado significativamente en DR4 negativos lo que se traduce en un RR muy alto para este antígeno. Existen otros estudios en los que no se ha encontrado ningún tipo de asociación con el HLA().

HLA-DR4 Y ARTRITIS REUMATOIDE*

CUADRO 5

GRUPO ETNICO	ESTUDIOS		CONTROLES		PACIENTES		RR**
	No.		No.	%	No.	%	
CAUCASICOS	17		632	27	1127	64	4.6
ORIENTALES	5		1329	39	348	66	2.8
NEGROS	3		367	10	109	40	5.4
MEXICANOS	3		289	26	82	66	4.7

* ()

** Riesgo relativo

SUBTIPOS DE HLA-DR4 EN CULTIVO MIXTO DE LINFOCITOS
CUADRO 6

SUBTIPO D	POSICION DEL AMINOACIDO						
	57	67	69	70	71	74	86
Dw4	Asp	Leu	Glu	Gln	Lys	Ala	Gly
Dw10	---	Ile	---	Asp	Glu	---	Val
Dw13	---	---	---	---	Arg	Glu	Val
Dw14	---	---	---	---	Arg	Glu	Val
Dw15	Ser	---	---	---	Arg	Glu	Val

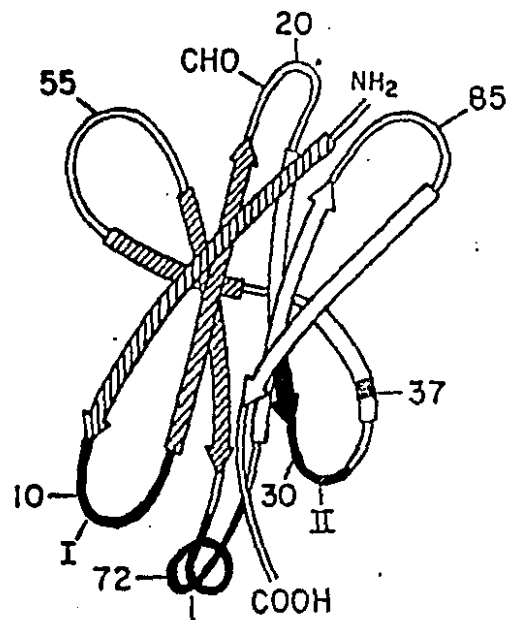
Nepom BS et al, 1983 ()

Investigaciones de subtipos de DR4 en cultivo mixto de linfocitos demuestran un incremento de Dw4 y Dw14 en caucásicos y de Dw15 en pacientes japoneses con AR, llama la atención que el DR4-Dw15 no se segrega en asociación con el DQW3. Las diferencias bioquímicas de estos subtipos están dadas (cuadro #6) en la tercera región hipervariable de la cadena DRB1, en la que se observa un cambio importante de carga en la posición 70 y 71, otro al hallarse un ácido aspártico y un ácido glutámico en Dw10 en lugar de una glutamina y una lisina en Dw4.

La estructura tridimensional de la molécula clase II por cristalografía de rayos X no está definida, pero un análisis de computadora de la secuencia de aminoácidos teniendo como modelo a las inmunoglobulinas muestra Fig # 6, que los aminoácidos (aa') antes mencionados se encuentran en una región alfa hélice que puede influenciar la interacción del MHC con el receptor de la célula T. La importancia de esta región fue demostrada primariamente en el ratón en el cual cambios en esta región alteran la habilidad del sistema inmune a responder a antígenos específicos además, incrementa la susceptibilidad a enfermedades autoinmunes: el H2-bm12 es una mutante espontánea de la cepa H2b, ambos alelos son genéticamente idénticos excepto por 3 aa' en la tercer región hipervariable de la molécula Ia (homóloga en el murino de la molécula clase II de el humano); así mismo se observan diferencias importantes en la respuesta inmune en cuanto a susceptibilidad a enfermedades, ya que el H2b es un modelo experimental para inducir Miastenia Gravis y el H2-bm12 es resistente. También el H2b presenta una gran respuesta a insulina.

FIGURA 6

PROBABLE ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE
LA CADENA B DE UNA MOLECULA CLASE II



Norcross MA & Kanehisa M, 1985

de buey y una baja respuesta a insulina de oveja en el H2-bm12 se observa todo lo contrario().

Dos grupos de investigadores han propuesto una hipótesis de la epitope compartida implicando que la etiología involucra la cadena B1 de DR4 en la susceptibilidad a AR. Ellos sugieren que diferencias estructurales entre diferentes cadenas DR4 B1 pueden influenciar la interacción de las moléculas MHC con el receptor de la célula T para reconocer y responder a antígenos extraños y aloantígenos ().

Sin embargo, el DR4 está asociado con DQw3 en un haplotipo y es difícil diferenciar entre la importancia relativa de DR y ó alelos DQ en la susceptibilidad a la enfermedad. En DQ existe polimorfismo a nivel de las dos cadenas (DQ alfa y DQ Beta) que es detectado por la técnica de RFLP en la que el DNA es segmentado con enzimas de restricción Bam III ó Hind III y se observan respectivamente fragmentos de 6.9/3.7 Kb y 3.4 Kb al hibridizar con sondas de DNA para DQB. A este patrón se le denomina DQ3.1 y con Bam III se genera un patrón de 12Kb que se llama DQw3.2. Las diferencias bioquímicas observadas son mostradas en el cuadro #7 en el que en la posición 57 se observa un cambio de ácido glutámico en DR4-DQw3.1 por alanina en DQw3.2. Estudios de haplotipos extendidos muestran un aumento significativo en DR4-DQ3.1 en pacientes con AR especialmente estos con la enfermedad severa(), sin embargo Wallin no encontró esta asociación, aunque los estados clínicos de estos pacientes no fueron definidos().

DIFERENCIAS EN LA SECUENCIA DE AA' EN EL PRIMER DOMINIO DE LA CADENA DQ BETA DE LA REGION DQ

CUADRO 7

DR-DQ	POSICION DEL AA'*				Asociacion AR
	13	26	45	57	
DR4, DQW3.1	A	Y	E	D	Positiva
DR4, DQ-blanco	G	G	G	D	Positiva
DR2, DQW1.2	G	L	G	D	Pos-Neutral
DR1, DQW1.1	G	G	G	V	Neutral
DR4, DQW3.2	G	L	G	A	Neutral

AA'*

McCusker CT, et al, 1988 ()

También en esta tabla se observa que el DR2, DQW1.2 con Acido glutámico en la posición 57 tiene una asociación positiva con la enfermedad. Sin embargo, el DR4, DQW3 forma parte de un haplotipo marcado con DRW53 y es difícil diferenciar entre la importancia relativa de DRBI, DQB ó DRBIV en la susceptibilidad a la enfermedad, especialmente por los hallazgos con anticuerpos monoclonales efectuados por Lee SH, en 1984 () en el que anticuerpo monoclonal 109d6 reconoce la tercer región hipervariable de DRW53 y es hallado en el 93% de los pacientes con AR y solo en el 44% de los controles con un RR de 10.0. Dúquesnoy, en 1983, y en 1987 (), reporta un anticuerpo denominado MC1 que reconoce una epitope que comparten DR4 y DR1

asociado a AR con un RR de 6.2. Todo lo anterior permite deducir que, aunque no se sabe cual es el papel de las moléculas clase II en la etiología o perpetuación de la AR, estas pueden ser importantes ya que pueden crear un sitio en DR ó en DQ, que es efectivo en presentar un péptido propio a la sinovial o a la célula Beta a clones de células T DR ó DQ péptido específicas.

En caucásicos existen estudios de haplotipos extendidos asociados a la AR en el que el HLA-B15(62) DR4 SC33 está incrementado en pacientes con AR ().

Aunque el 90% de los estudios inmunogenéticos de la AR han sido enfocados a el sistema principal de histocompatibilidad existen reportes de estudios de los alotipos pesados de las inmunoglobulinas (GM) en el que no hallan diferencias significativas entre la frecuencia de alotipos o fenotipos de los pacientes con AR y los grupos control(), sin embargo el alotipo G1m(x) estuvo incrementado en pacientes con HLA-DR4 (+) comparado con pacientes HLA-DR4(-). También se han realizado estudios de los alotipos de las cadenas ligeras Kapa (Km), alfa 1 antitripsina en los que no se han hallado diferencias entre pacientes y controles (). Debido al importante papel del receptor de la célula T en la respuesta inmune Arakawa, en 1988 (), realizó un estudio familiar de 15 individuos en los que 6 tenían AR(padre+5 hijos), todos los 15 fueron DR4(+) y al hibridizar con DRB1 todos tuvieron el mismo patrón, en cambio al hibridizar con el receptor de la célula T, todos los 5 hijos tuvieron un patrón homocigoto y en 10 no hubo homocigocidad. Existen aun pocos estudios pero es indudable que este es un campo que puede aportar mucho al conocimiento de la enfermedad.

OBJETIVOS

En vista, del desequilibrio génico en el sistema HLA en diversos grupos humanos, es posible que en la población mexicana los antígenos asociados a AR sean distintos de los que se encuentran en otras poblaciones por tanto, se diseñó la presente investigación con los siguientes objetivos:

1. Identificar genes dentro del sistema principal de histocompatibilidad que le confieran susceptibilidad a Artritis Reumatoide a mestizos mexicanos.
2. Identificar los fenotipos serológicos de las moléculas clase II en los pacientes con Artritis Reumatoide.

MATERIALES

Y

METODOS

MUESTRA

Este es un estudio en 25 familias mexicanas (grupo de personas emparentadas en primer grado: padres, hermanos y/o hijos, residentes en la republica Mexicana con al menos tres generaciones nacidas y radicadas en Mexico según información proporcionada por los familiares). que poseen al menos 1 caso indice (Individuo mayor de 18 años, que ingreso por la consulta externa en el área de reumatologia, que llena los criterios de la ARA (Association Rheumatologist American) para Artritis Reumatoide del adulto) , Las familias fueron clasificadas según seleccion multiple incompleta y selección completa. El diseño experimental de este estudio es transversal, observacional, y analitico/descriptivo para comparar estas familias (enfermos y sanos) con poblacion general en relación a marcadores genéticos del sistema HLA asociados a la nosologia antes citada.

TIPIFICACION DE MOLECULAS CLASE I Y II

1. MATERIALES Y EQUIPO

Jeringas esteriles

Agujas esteriles

Pipetas graduadas (1,2,5,10, 50 ml)

Pipetas Pasteur

Jeringa Hamilton de disparo constante (1ul)

Jeringa multiple Hamilton de disparo constante (5 ul)

Jeringa multiple Hamilton de disparo constante (1 ul)

Tubos Falcon de 50 ml
Tubos de vidrio , 13X100 ml
Tubos Fisher
Cajas Petri
Fibra de nylon-lana
Camara de Newbauer
Balanza analitica
Microplacas para microlinfotoxicidad, Nunc
Vortex
Centrifuga refrigerada CO-500 Damon/JEC Devison
Centrifuga Fisher
Microscopio Invertido de contraste de fase (Zeiss)
Microscopio optico
Negatoscopio

B. REACTIVOS

1. HEPARINA

Se utiliza como anticoagulante, (1000 UI/ml) un volumen de 100 UI por cada 10 ml de sangre.

2. MEDIO RPMI 1640

Medir 950 ml de agua desionizada en un matraz Erlenmeyer, añadir el contenido de un sobre del medio al agua, agitar , añadir 2g de Bicarbonato de sodio. agregar los 50 ml restantes de agua desionizada. Ajustar el PH 0.2 a 0.3 unidades por arriba del pH deseado (7.35). Usar NaOH o KCl 1N para ajustar. Esterilizar por milliporo de 0.22 . Guardar a 4 C.

3. FICOLL HYPAQUE

Ficoll 9% en agua destilada 12 partes

Hypaque 34% en agua destilada 5 partes (Winthrop).

La densidad de la mezcla debera ser de 1.076-1.078

4. SOLUCION AMORTIGUADORA SALINA DE FOSFATOS (PBS)

NaCl 15.3 g

Na₂HPO₄ 7.6 g

KH₂PO₄ 0.125 g

A. D. hasta 2 lts

Llevar hasta pH 7.4 con HCl 6N

5. COMPLEMENTO

SELECCION DE LOS CONEJOS

1. Los conejos deben ser de la raza Nueva Zelanda NZB
2. Deben estar libres de parásitos, si no, debe hacerse un programa para desparasitarlos.
3. Deben estar libres de coccidia
4. El complemento para moléculas clase I se obtiene de conejos de 1 1/2 kg (6-7 semanas de vida)
5. El complemento para las moléculas clase II se obtiene de conejos recién nacidos (20 días) alrededor de 500 grs.

PREPARACION DEL COMPLEMENTO

1. Los conejos deben ser sangrados a blanco por punción cardiaca, (debe evitarse traumatismo para evitar hemólisis).
2. La sangre recolectada debe colocarse a 4 C hasta que se forme el coagulo .
3. Centrifugar a 2500 rpm 15' .

ENSAYO DE TOXICIDAD PARA EL COMPLEMENTO

Testigos

1. Celulas en medio de cultivo.
 2. Celulas en medio + complemento
 3. celulas en medio + antisuero especifico +complemento
 4. Este ensayo de linfotoxicidad se realiza como una tipificación de HLA (ver p) y se debe deshechar el complemento con citotoxicidad natural.
 5. Se alicuota el complemento y se guarda a -70 C (dura 6 meses a 1 año).
6. **FIBRA DE NYLON-LANA**

Se utiliza Nylon marca Fenawel, si no se cuenta con este material se emplea fibra de nylon "celanese". y se trata:

1. Se lava la fibra con HCl 1N 3 veces .
2. Se elimina el HCl con agua destilada.
3. Se lava 3 veces con NaOH 1N.
4. Se lava el exceso de alcali con AD

5. Se confirma el pH hasta que el ultimo lavado sea igual al del agua.
6. Se pone a secar extendida en la estufa a 37 C

PREPARACION DE LA COLUMNA

1. En caja de petri se peinan 0.3 gr de N.L. con pinzas o pipeta pasteur.
2. Se empacan cuidadosamente en una jeringa de 10 ml revisando que este sea uniforme.

MATERIAL BIOLÓGICO

1. 20 ml de sangre venosa heparinizada
2. Eritrocitos de carnero al 4% en PBS
3. Antisueros de diferentes especificidades obtenidos de diferentes fuentes

TECNICAS

A. SEPARACION DE LOS LINFOCITOS TOTALES POR GRADIENTE DE FICOLL-HYPAQUE

1. Se toman 20 ml de sangre venosa heparinizada
2. Se diluye la sangre con un volumen igual de PBS PH 7.4
3. Se colocan 15 ml de ficoll hypaque en un tubo de 50 ml de

marca falcon y se le agrega la dilución de la sangre y el PBS cuidadosamente por las paredes del tubo.

4. Se centrifuga a 2500 rpm 20' a temperatura ambiente
5. Se aspira con pipeta pasteur la interfase formada por la capa de mononucleares y se pasa a otro tubo.
6. El paquete de mononucleares se diluye en PBS y se centrifuga a 1000 rpm 10' para eliminar plaquetas.
7. Se descarta el sobrenadante y el paquete se resuspende en PBS y se centrifuga a 1000 rpm 10'
8. Se repite el paso 7
9. Se descarta el sobrenadante y el paquete se resuspende para ajustar a 5×10^6 .
10. Estos linfocitos se pueden utilizar para la tipificación de moléculas clase I.

B. PURIFICACION DE LINFOCITOS T Y B

Para la purificación de los linfocitos T y B se utilizaron tres técnicas diferentes; las tres técnicas por inmunofluorescencia tuvieron una pureza de 80-100% de linfocitos B.

TECNICA DE NYLON-LANA

1. Los linfocitos previamente purificados y resuspendidos en 2 ml de RPMI+10%SBF se colocan en la columna de nylon a la que previamente se ha lavado con 5 ml de RPMI y se ha activado con 10 ml de RPMI +10% SBF durante 30', hasta que todo el líquido penetre en el nylon. Inmediatamente después se coloca la columna en posición horizontal.

2. Se incuba horizontalmente 45' a 37 C
3. Se coloca la columna sobre un tubo marcado para los linfocitos T y se deja escurrir el contenido.
4. Se le agregan por la jeringa 30 ml de RPMI + 10% SBF
5. Se coloca la columna sobre un tubo marcado para los linfocitos B y se le agregan 30 ml de RPMI+ SBF 10% frio.
6. Se centrifugan las células T y B a 1500 rpm durante 10' y se ajustan a 5×10^6 /ml.

NOTA: Al comenzar la separación se debe alicuotar el RPMI a 4 C y a 37 C para que al momento de usarlo tenga la temperatura deseada, no debe comprimirse el nylon lana dentro de la jeringa por que esto da mucha suciedad a la muestra.

SEPARACION DE CELULAS B POR LIMPHO-KWIK

TECNICA COMERCIAL

Para la separación de 0.5 a 2×10^6 de linfocitos B

1. Obtener de 5 a 20 millones de linfocitos totales a partir de ficoll-hypaque
2. Pasar el botón de linfocitos a un tubo de 1 ml marca fischer y centrifugarlo a 1000 g por un minuto.
3. Añadir 0.8 ml de reactivo 1 y mezclar bien
4. Incubar a 37 C por una hora en baño maria o incubador y mezclarlo ocasionalmente
5. Terminada la incubación adicionar 0.2 de RPMI+ SBF10% y centrifugar 2 minutos a 2000 rpm
6. Descartar el sob y agregar 0.5 ml de reactivo 2 mezclar bien.

7. Centrifugar a 200 rpm dos minutos
8. Retirar el sbn y lavar los linfocitos dos veces con RPMI+10% SBF, centrifugarlo a 1000g un minuto
9. Resuspender con 1 ml de medio el botón celular y contar viabilidad en caso de presentar células muertas remover con DNasa o gradiente de ficoll-hypaque.

RECOMENDACIONES: Estos reactivos son útiles para los siguientes tipos de muestras: diabéticos, Hodgkin, cáncer no leucémico y donadores cadavéricos. Su uso no se recomienda en células congeladas y muestras de más de dos días.

SEPARACION DE CELULAS T Y B MEDIANTE LA FORMACION DE ROSETAS

1. Se utilizan GRC de máximo 2 semanas de almacenamiento en solución de Elserver, lavados tres veces con PBS y ajustados al 4%.
2. Los linfocitos ya purificados por Ficoll-Hypaque y resuspendidos en RPMI+10% SBF a una concentración de 5×10^6 son colocados en caja de petri e incubados a 37 C durante 1 hora (para eliminar macrófagos).
3. Posterior a la incubación con pipeta pasteur se recolecta el medio con células resuspendido y se enjuaga la caja con RPMI y este también es recolectado en el mismo tubo.
4. Se centrifugan las células y se concentran a 10×10^6 por ml en RPMI+10% SBF.
5. Se le agrega la mitad de su volumen en SBF
6. Se agregan GRC en igual cantidad que las volumen inicial de de la concentración de células.

7. Se centrifuga en frio a 400 g 10'.
8. Se incuba a 4 C durante 12 a 18 horas.
9. se mezcla la suspensión y se deposita un gradiente de ficoll-hypaque (todo a 4 C)
10. Se centrifuga a 2000 rpm 20'.
11. El botón se resuspende en PBS y se centrifuga 2 veces a 1000 rpm 10'.

ENSAYO DE MICROLINFOTOXICIDAD PARA TIPIFICACION DE ANTIGENOS

CLASE I Y II

1. En cada uno de los pozos de las cajas con antisueros se coloca 1 ul de la suspensión de células T o B.
2. Las cajas con los antisueros para clase I se incuban durante 30' y las microplacas para los clase II 60'
3. Se agregan 5 ul del complemento de conejo correspondiente para cada molécula (I y II) a cada pozo.
4. Las microplacas para las moléculas clase I se incuban durante 1 hora y las de moléculas clase II se incuban 2 horas.
5. Se agregan 2 ul de eosina a cada pozo, y se deja reposar 3 a 5'.
6. Se agregan 5 ul de formalina.
7. Se lee en microscopio invertido , se cuenta el número de células vivas y muertas y los resultados se informan de acuerdo a la siguiente relación:

% de mortalidad	Numero
0 al 10	1
11 - 20	2
21 - 40	4
41 - 80	6
81 - 100	8

TIPIFICACION DE LAS MOLECULAS CLASE III

— FACTOR B (FB) DE LA VIA ALTERNA DEL COMPLEMENTO

El polimorfismo de el factor B se determina mediante la técnica de inmunofijación y electroforesis en gel de agarosa. La electroforesis es de alto voltaje y una vez finalizada, las bandas de las proteínas se fijan mediante anticuerpo específico.

A. Equipo

1. Cámara Deluxe para electroforesis Gelman Science.
2. Fuente de Poder Deluxe Gelman Science
3. Bomba de agua circulante Thomas Scientific
4. Centrifuga C)-500 Damon/ JEC Devision
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 Colloids. 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 #1
5. Aplicador de muestras
6. Micropipetas de 15 y 25 ul
7. sujetadores

C. REACTIVOS

1. Amortiguador de barbital y lactato de calcio Ph 8.6
0.05M
2. Agarosa Sea-Kem Marine Colloids Maine USA. al 1% en
amortiguador de barbital
3. Solución salina 0.85%
4. Glicerol
5. Solución de azul de Coomassie al 2.5% (en una
solución 45% metanol, 10% ácido acético en agua
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. Alicuota de hemoglobina humana normal.
3. Anticuerpo anti-factor B. Atlantic Antibodies.
Scarborough, Mo USA)

E. TECNICA

1. Preparación del gel

Cubrir la placa de vidrio mediante una brocha con una capa 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 de vaciar la solución de agarosa caliente y se deja solidificar. Ya que se solidifica el gel, se quitan los sujetadores y el marco de plástico, se seca con papel filtro la zona donde se aplicarán nuevas muestras.

2. Aplicación de las muestras

Con papel filtro whatman No.1 se seca aproximadamente 3 cm 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 y última perforaciones se colocan aproximadamente 10 ul de hemoglobina A que sirve como indicador y en las demás se coloca el mismo volumen de cada muestra (alrededor de 10 muestras).

Se espera hasta que las muestras se hayan absorbido en

el gel (aproximadamente 15 min.) Se quita el exceso de muestra que no penetró con papel Whatman No. 1 se retira el aplicador de plástico (MASK).

C. Corrimiento de las muestras

Las plâcas se colocan sobre bases enfriadas por agua circulante entre 6 y 10 C. Para evitar el sobrecalentamiento de agarosa.

- El contacto entre el gel y el amortiguador electrodo. se realiza mediante una "mecha constituida por 4 hojas de papel filtro Whatman No.1 (del mismo ancho que la placa del gel) perfectamente humedecida en el amortiguador. Una de las puntas de la mecha se coloca atras de las muestras y la otra a 1cm del final del gel entre las dos mechas debe haber una distancia de 6.5 cm .
- La superficie del gel se cubre con un plástico o vidrio para prevenir desecamiento y la electroforesis se lleva a cabo a 350 V (75 mA) hasta que la hemoglobina haya migrado hasta la segunda mecha (alrededor de 3 horas).

D. Inmunoprecipitación

- Las bandas del fB emigran en una zona de 3 a 6.5 cm del origen . En esta zona debe aplicarse el antisuero específico anti-fB humano.
- Se incuba el gel durante 1 a 2 horas a temperatura ambiente en una cámara húmeda horizontal.

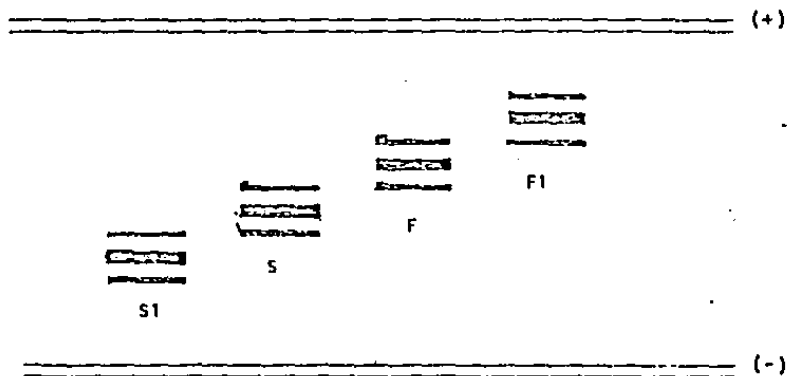
- Se enjuaga posteriormente el gel con agua destilada y se cubre completamente la superficie con papel Whatman, el cual ha sido humedecido con agua destilada. Esto, se cubre ahora con aproximadamente 12 hojas de papel secante tipo toalla. Se coloca encima una placa de plástico y un peso de 4 Kgs.
- Se remueve despues de 10 min y se quita el peso y el papel. Posteriormente el gel se enjuaga durante toda la noche en 1 litro de solución salina para remover restos de proteínas inespecificas.
- Enseguida, el gel se lava en agua destilada durante 20 min , se seca al aire libre o aplicando calor.
- Se tñe la placa durante 10 min con solución azul de Coomasie.
- Se destñe la placa con la solución decolorante hasta obtener el mejor contraste.
- Se deja secar el exceso de metanol a temperatura ambiente.
- Se lee la placa.

Las variantes electroforéticas obtenidas se muestran en la figura #8.

TIPIFICACION DEL FACTOR C4 DEL SISTEMA DEL COMPLEMENTO

El cuarto componente del complemento C4 es codificado por dos loci cercanamente unidos entre si y localizados entre los loci H1A-B y H1A-D en el brazo corto del cromosoma 6 humano. La

FIGURA 8 POLIHORFISMO DEL FACTOR B DEL SISTEMA DEL COMPLEMENTO



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.

electroforesis seguida de inmunoprecipitación y tinción de muestras de plasmas con EDTA, previamente tratados con neuraminidasa para eliminar el ácido siálico, revela que cada locus de C4 (C4A y C4B) son altamente polimórficos.

TECNICA

1. Desialación

- 10 ul de la muestra se mezclan con 2 ul 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 de 26 cm x 12.5 cm con una solución de agarosa al 0.4% en agua destilada, se deja secar.
- Se forma un molde colocando encima de la placa anterior una segunda placa de plástico siliconizado de 1mm de espesor. se mantienen juntas las placas mediante clips metálicos.
- Se vierte la solución de agarosa de corrimiento para C4 aun 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.

C. Aplicación de la muestra

- Se reduce el exceso de agua del gel de corrimiento, colocando 2 veces sobre el una tira de unos 5 cm. de

ancho de papel filtro Whatman No.1

- Se coloca el aplicador plástico para muestras (MASK), de tal forma que las muestras quede. a unos 2 cm del extremo final del gel.
- Se colocan 7 a 10 ul de muestras dializadas en cada ranura del aplicador.
- Se coloca una muestra de HbS al final y al principio como marcador visual.
- Una vez que las muestras estan a una distancia de 10.5 cm.1 gel, se retira el aplicador.

D. Corrimiento electroforetico

- Se coloca la placa con el gel en el equipo de electroforesis, con las muestras en el catodo
- Se utilizan 5 hojas de papel Whatman No.1 (del tamaño de la placa del gel) y se colocan en el amortiguador de corrimiento . y en el anodo tambien se hace lo mismo. quedando entre las dos mechas una distancia de 10.5 cm.
- Se cubre la placa para evitar desecamiento del gel y se ajusta la fuente de poder a una corriente constante de 65 mA (300-350 volts) y se deja el corrimiento hasta que el marcador de la HbS ha alcanzado el extremo opuesto (4-5 horas).

E. Inmunoprecipitación

- Se diluyen 0.4 ml. de antisueron anti-C4 humano con 0.6 ml de solución salina.
- Se distribuye la solución de antisuero en un rea de 5 cm en el centro del gel.
- Se incuba durante 1 - 2 horas en cámara húmeda.

- Se enjuaga cuidadosamente el gel bajo un chorro de agua
- Se cubre el gel con una hoja de papel Whatman No.1 humedecido con AD , seguido de 10 hojas de papel absorbente tipo toalla y una placa de vidrio o plástico. Se coloca encima un peso de 4 Kgs. se deja así 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 el gel.
- Se tinte el gel seco con azul de coomasie
- Se decolora hasta alcanzar un contraste óptimo

Los patrones de bandas obtenidas se observan en la figura #9

TIPIFICACION DEL FACTOR C2 DEL SISTEMA DEL COMPLEMENTO

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

TECNICA

A. Preparación de la solución de eritrocitos de carnero sensibilizados

- Se toman 20 ml de eritrocitos de carnero al 10%

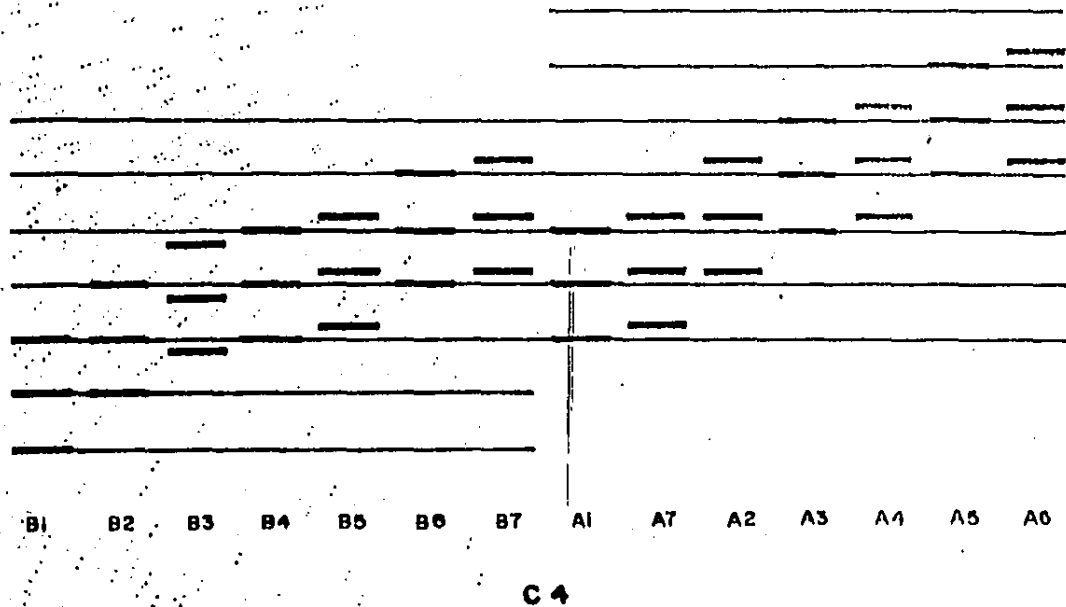


Figura 9 Esquema donde se muestran las variantes electroforéticas de C4

- Se lavan 4 veces con solución de VBS-EDTA 0.01 M a 2000 rpm durante 10 min.
- Se lavan 4 veces a 2000 rpm durante 10 min con solución de GVB (agarosa-VBS)
- Se resuspende el paquete celular con GVB (1 parte de células a 10 partes con GBV).
- En una celda de espectrofotómetro se adicionan 0.1 ml de la suspensión celular y 2.4 ml de agua destilada
- Se ajusta a cero con un blanco de AD
- Se lee la concentración de hemoglobina a una longitud de onda de 541 nm.
- Cuando la absorción es de 0.420, la concentración celular es de 1×10^8 células/ml. El rango de aceptación para la concentración es de 0.40-0.43 nm. para llegar a la concentración requerida se utiliza la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Lectura obtenida} \times \text{Volumen de la suspensión celular}}{0.420} = \text{volumen al que se debe llegar concentración}$$

- Se incuba 15 min a temperatura ambiente
- Los eritrocitos sensibilizados se guardan a 4 C

B. Preparación del gel

- Se coloca sobre un vidrio de 20.5 cm x 15 cm, un marco de plástico siliconizado de 1mm de espesor y 0.5 cm de ancho. (el marco cubre 3 lados) Encima de este último

se coloca un placa de plástico siliconizado de las mismas dimensiones de el vidrio. Se mantienen las placas juntas con clips metálicos, de tal forma que se obtienen una camara de 1 mm de espesor, con un extremo abierto.

- Para hacer el gel se combina solución stock de acrilamida. 26.5 ml anfolina 1.5 ml de solución de riboflavina 7 ml
- Se vacia la mezcla con la ayuda de una pipeta de boca ancha y se deja polimerizar el gel bajo una lámpara de luz fluorescente durante una hora.
- Se enfoca el gel durane 18 horas, o hasta que la corriente haya caído a 2 mA/gel.

E. Ensayo hemolitico funcional

- Despues del electroenfoque, se enjuaga el gel en una solución de yoduros durante 30 min. a temperatura ambiente.
- Se vacia la solución de yoduro y se enjuaga el gel durante 30 min a temperatura ambiene en 500 ml. de la solución de VBS- Ca , Mg .
- Despues de enjuagar la placa con el gel, se coloca un marco de 2mm. de espesor y un vidrio de 20.5 cm x 15 cm y se fija con clips.
- Se hace la siguiente mezcla y se vacia en la cámara anterior Solucion VBS Ca Mg 7.5 ml, agarosa al 2% 7.5 ml, solución de eritrocitos sencibilizados 0.75 ml, suero deficiente en C2 0.2 ml.

- Se incuba el gel durante 1 hora a 4 C y despues a 37 C (durante 2 a 4 horas) hasta que las bandas de la lisis aparezcan.
- Se separa cuidadosamente los vidrios qu forman la cámara y se coloca el gel en un vidrio limpio.
- Se obtiene solamente la capa de erictrocitos y se lava en una solucin que contiene 300 ml de PBS y 3 ml de gluteraldehido. Se enjuaga 30 min. Se deja secar a temperatura ambiente.

Los patrones obtenidos pueden verse en la figura #10

POLIMORFISMO DEL SEGUNDO COMPONENTE DEL SISTEMA DEL COMPLEMENTO

FIGURA 10



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

- Se incuba el gel durante 1 hora a 4 C y despues a 37 C (durante 2 a 4 horas) hasta que las bandas de la lisis aparezcan.
- Se separa cuidadosamente los vidrios qu forman la cámara y se coloca el gel en un vidrio limpio.
- Se obtiene solamente la capa de erictrocitos y se lava en una solucin que contiene 300 ml de PBS y 3 ml de gluteraldehido. Se enjuaga 30 min. Se deja secar a temperatura ambiente.

Los patrones obtenidos pueden verse en la figura #10

POLIMORFISMO DEL SEGUNDO COMPONENTE DEL SISTEMA DEL COMPLEMENTO

FIGURA 10



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

ANALISIS ESTADISTICO:

El diseño del estudio es transversal (es decir la tipificación del HLA clase I, II y III es única), propectivo (la lectura o recopilación de los datos o variables se hizo prospectivamente), observacional (se observo la estructura genetica en el sistema HLA, no se introduce ninguna maniobra experimental) y analitico/descriptivo (se busca asociación o relación de causalidad entre herencia y patologia y describe los haplotipos que luego se analizan), comparativo por que contrastan en una misma familia afectados, portadores y sanos (en relación a haplotipo) y los pacientes con la población general. Para el analisis estadístico se usaron las pruebas de:

- X cuadrada

La comparación entre dos grupos de estudio en función de dos características independientes, se efectua generalmente mediante tablas de contingencia de 2 x 2

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

ANALISIS ESTADISTICO:

El diseño del estudio es transversal (es decir la tipificación del HLA clase I, II y III es unica), propectivo (la lectura o recopilación de los datos o variables se hizo prospectivamente), observacional (se observo la estructura genetica en el sistema HLA, no se introduce ninguna maniobra experimental) y analitico/descriptivo (se busca asociación o relación de causalidad entre herencia y patologia y describe los haplotipos que luego se analizan), comparativo por que contrastan en una misma familia afectados, portadores y sanos (en relación a haplotipo) y los pacientes con la población general. ~~Para el analisis estadístico se usaron las pruebas de:~~

- X cuadrada

La comparación entre dos grupos de estudio en función de dos características independientes, se efectua generalmente mediante tablas de contingencia de 2 x 2

	Grupo A	Grupo B	
+	a	b	a+b
Característica :			
-	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 2x 2 se evalúa mediante la prueba estadística X²

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

Si el valor obtenido de la prueba de X² implica un valor de "p" menor a 0.05, la hipótesis nula que dio lugar a la comparación se rechaza. Un valor de p < 0.05 significa que en menos de 1 en 20 casos se comete error al rechazar la hipótesis nula. El valor de "p" se obtiene el interpolar en tablas de distribución X² el valor numérico de X² en función de los grados de libertad de la prueba. Para todas las tablas de contingencia de 2x2 se considera un grado de libertad. Si las cifras esperadas en a, b, c ó d fueran menores a 5, la prueba de X² deja de tener validez y se debe utilizar en este caso la prueba exacta de Fisher que nos da directamente el valor de "p".

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

El valor de P fué corregido por el número de especificidades usadas. Se calculó el riesgo relativo RR para cada antígeno estadísticamente significativo.

$$RR = \frac{a \times c}{b \times d}$$

R E S U L T A D O S

Se tipificarón 25 familias que incluyeron 29 pacientes con artritis reumatoide definida ó clásica. El grupo consistió de 25 mujeres (89.2%) y 3 hombres (10.7%). En los cuadros #8-12 se describen los haplotipos de los pacientes con AR, sus familiares, y controles tomados de estudios de familias sanas. En las figuras # 11 - 35 se presentan los árboles genealógicos correspondientes a cada familia. Las letras a y b corresponden a los haplotipos paternos y las letras c y d a los haplotipos maternos, estos haplotipos son asignados en base a las tipificaciones de todos los miembros de las familias, excepto en las familias # 11,14 en que solo se describen los dos haplotipos del paciente y se plantea la posibilidad de un estudio longitudinal.

En las figuras # 36, 37, 38 y 39 se muestra la frecuencia de los antígenos para los loci A, B, DR y para los complotipos, es necesario citar que algunos antígenos dada su baja frecuencia debido al alto polimorfismo de este sistema se graficaron en conjunto como "otros". En el cuadro # 13 se presentan los antígenos del MHC estadísticamente significativos y su riesgo relativo. El A1 se encuentra incrementado en los pacientes con -4 respecto a los controles ($P < 3.5 \times 10^{-4}$), este dato es muy llamativo, sin embargo se debe tomar con mucha cautela por que los antisueros de tipificación usados en los controles dan mayor especificidad en reactividad cruzada, lo que crea un sesgo en los resultados.

El B8 presentó un RR de 8.7, y el DR3 se encontró

significativamente incrementado en los pacientes con respecto a los familiares+controles ($P < 0.025$) que no fué significativo al corregir por el número de especificidades usadas, a pesar de esto presentó un RR 4.3. Se debe tener en cuenta que el A1, B8, DR3 forma parte de un haplotipo extendido caucasico y que este desequilibrio de ligamiento aunque no esta significativo con respecto a los controles su frecuencia es de 8%.

En el mismo cuadro la frecuencia del HLA-DR4 fue mayor en los pacientes que en los familiares ($P < 0.05$), sin embargo en los está significancia no persistió al corregirse la "p", este antígeno presentó un RR de 3.4 para la enfermedad. El DRw53, que se segrega en desequilibrio con el DR4 y DR7 se encontró mucho mas frecuente en los pacientes que en sus familiares ($P < 0.025$, P_c no significativa) y RR 2.8, no se reportan los datos de los controles porque son insuficientes.

Contrastando con estos resultados el DR1 y DR8 se encuentra con mayor frecuencia en los pacientes y controles respectivamente, dando con ello un "efecto protector" en estos grupos con respecto a la AR.

La combinación de los alelos del complemento (complotipos no mostró diferencias significativas en los 3 grupos, el FB*F presentó una frecuencia muy alta en los pacientes con respecto a los 2 grupos control ($P_c < 3.5 \times 10^{-4}$) y scabe señalar que FC31 tiene una frecuencia en AR de 6/53 (0.113) mucho mayor que en familiares 1/35 (0.028) y controles 1/51 (0.019). El alelo nulo en C4A muestra un incremento no significativo al ser corregido ($P < 0.05$) en los pacientes con respecto a los grupos control, que es importante dada la alta frecuencia de alelos nulos en la

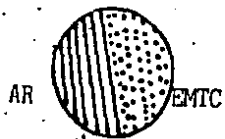
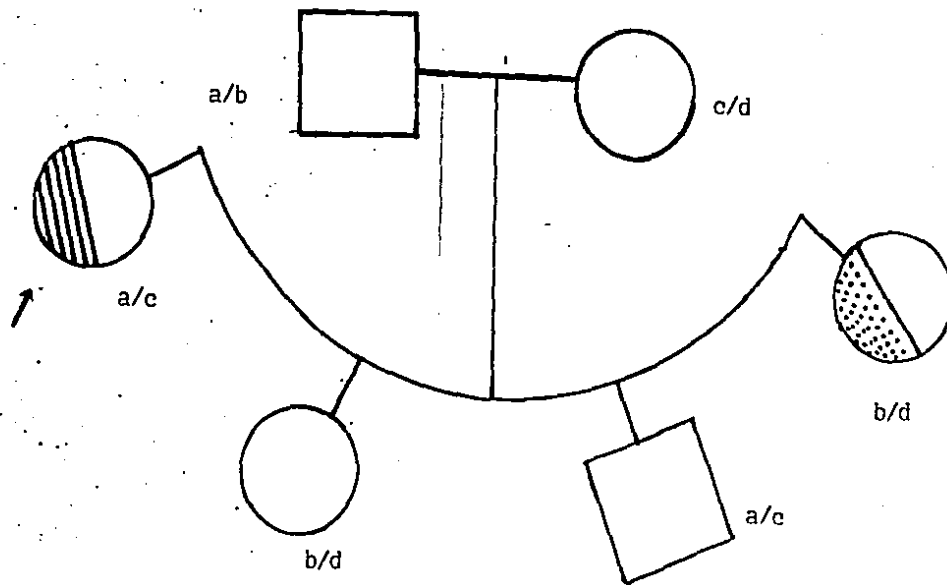
población estudiada mexicana.

En la figura # 40 se presentan los fenotipos DR de los pacientes (A) y de los familiares(B), en las que se puede observar la alta frecuencia de fenotipos marcados por el antígeno DR4 en la población estudiada y la diferente combinación con el cromosoma homólogo en los pacientes (con DR3 y DR7) y en los familiares (con DR1 y DR5).

En el cuadro # 14 se enlistan según la frecuencia mayor de los pacientes en DR la combinación con el locus A y los complementos.

FIGURA # 11

FAMILIA No.1

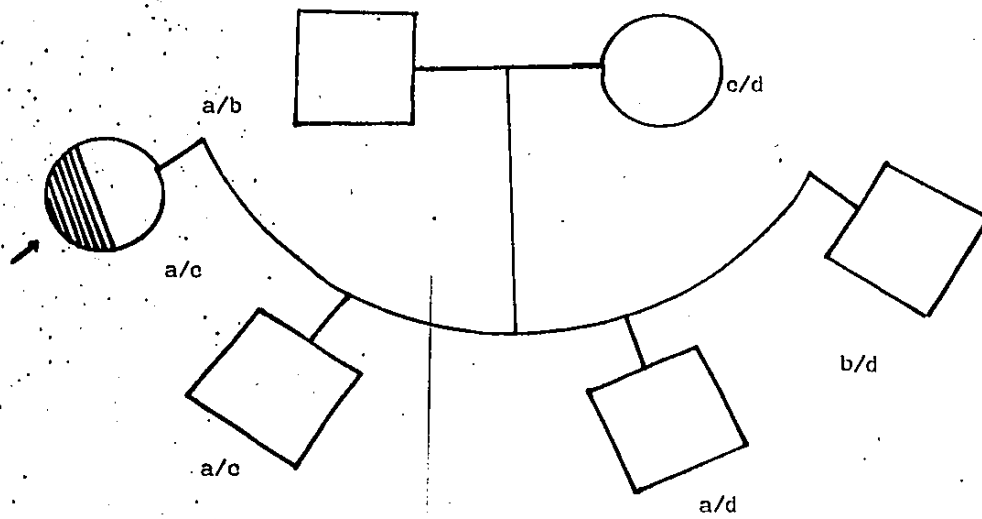


- A) A9 B16 DR4 DQw3 DRw53 SC42
- B) A28 B7 DR4 DQw3 DRw53 SC01
- C) A10 B39 DR4 DQw3 DRw53 SC42
- D) A9 B12 DR8 DQx DRw52 SC31

42

FIGURA # 12

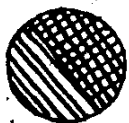
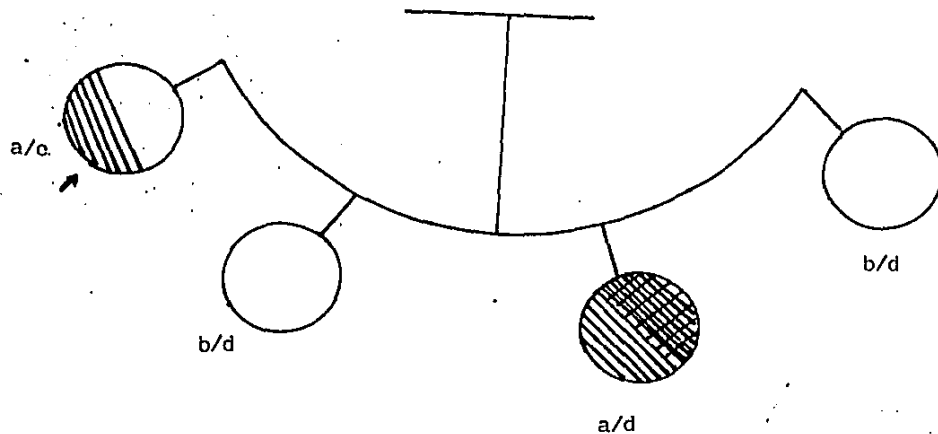
FAMILIA No.2



- | | | | | | | |
|----|----|-----|-----|--------|-----|-------|
| A) | A1 | Bx | DR5 | FC31 | DQ3 | DRw52 |
| B) | A3 | B40 | DR1 | SC32,0 | DQ1 | DRwX |
| C) | A1 | B14 | DR1 | SC22 | DQ1 | DRwX |
| D) | A1 | B17 | DR7 | SC31 | DQ2 | DRw53 |

FIGURA # 13

FAMILIA No.3



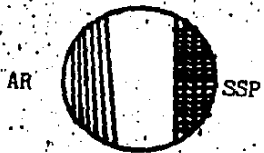
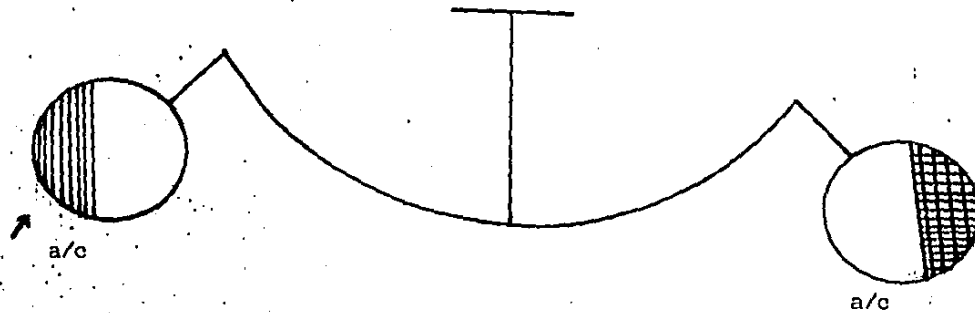
Lepra

AR

- | | | | | | | |
|----|----|-----|-----|------|-----|-------|
| A) | A2 | B12 | DR4 | FC01 | DQ3 | DRw53 |
| B) | A2 | B7 | DRx | SC31 | DQX | DRwX |
| C) | A2 | B12 | DR7 | FC31 | DQ2 | DRw53 |
| D) | A9 | B40 | DR3 | SC31 | DQ3 | DRw52 |

22
FIGURA # 14

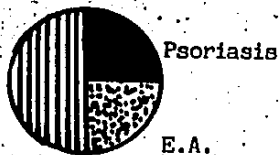
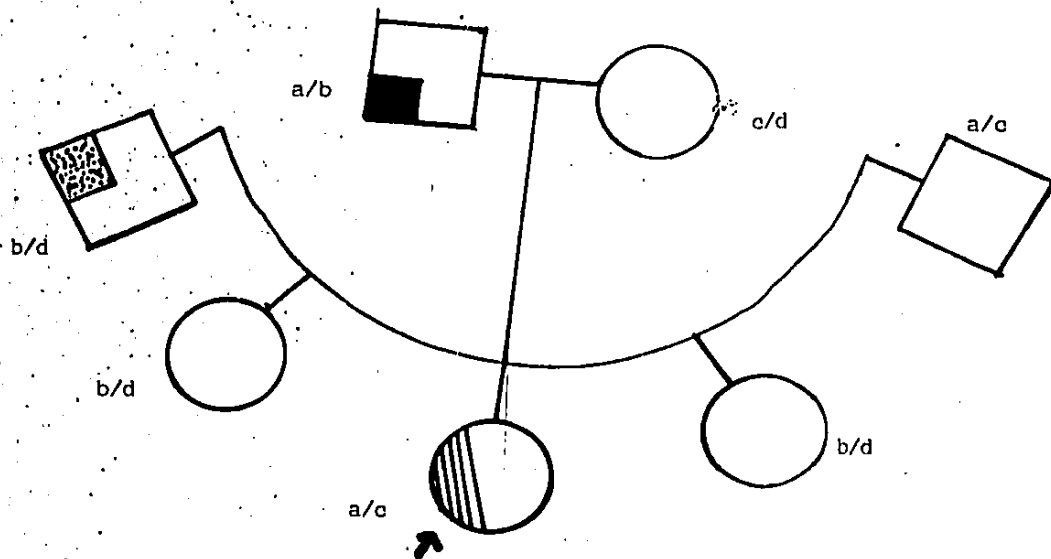
FAMILIA No. 4



- A) A1 B8 DR3 FC30 DQ3 DRw52
B) Ax B15 DR2 SC31 DQ1 DRwX

FIGURA # 15

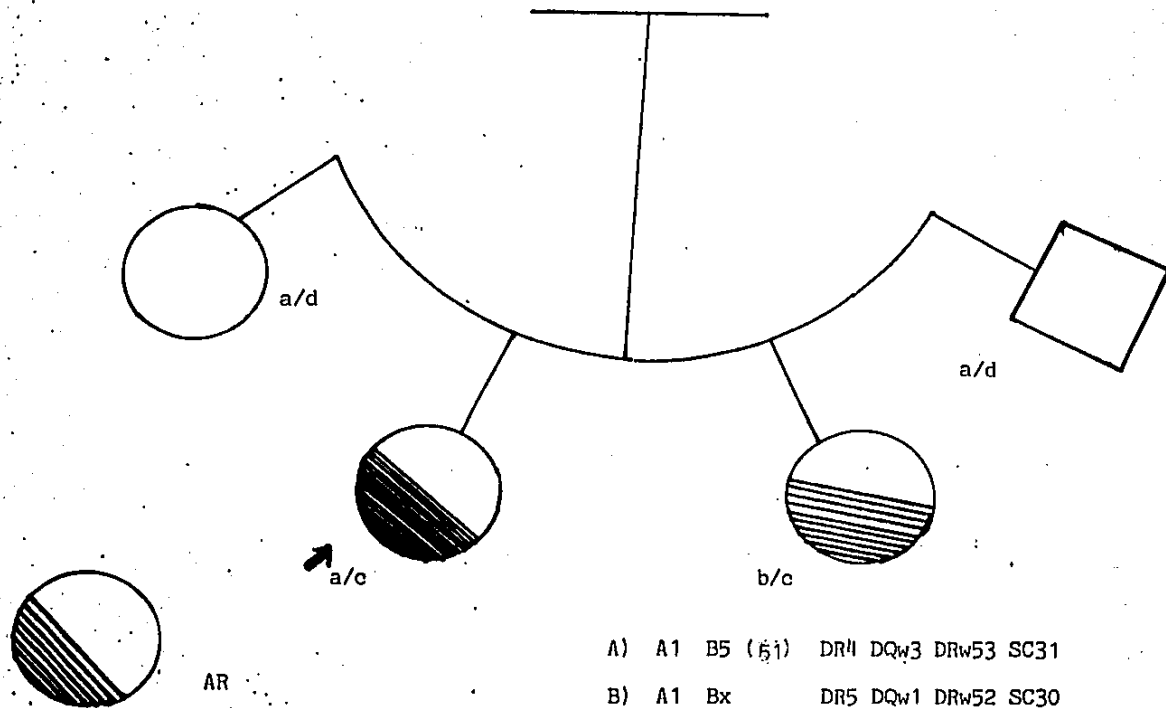
FAMILIA No.5



- A) A2 B51 DR5 SC20 DQ3 DRw52
- B) A3 Bx DR2 SC31 DQ1 DRw53
- C) A2 B12 DR4 SC32 DQ3 DRw53
- D) A28 B27 DR1 SC31 DQ1 DRwX

FIGURA # 16

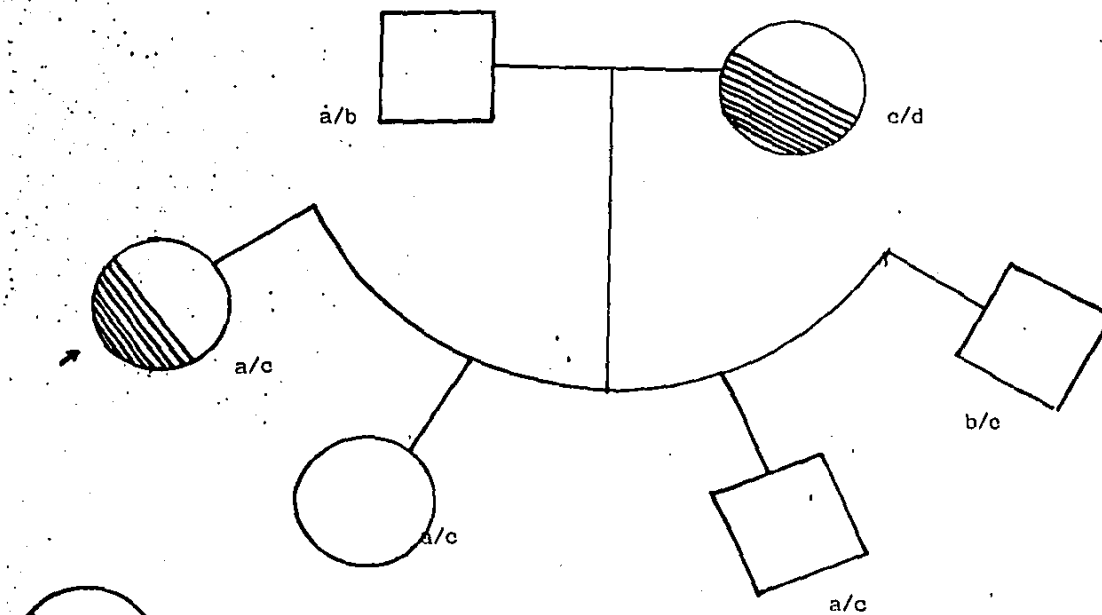
FAMILIA No.6



- | | | | | | | |
|----|-----|---------|-----|------|-------|------|
| A) | A1 | B5 (61) | DR4 | DQw3 | DRw53 | SC31 |
| B) | A1 | Bx | DR5 | DQw1 | DRw52 | SC30 |
| C) | A28 | B40 | DR3 | DQ3 | DRw52 | SC01 |
| D) | A9 | B41 | DR5 | DQ1 | DRw52 | SC1 |

FIGURA # 17

FAMILIA No.7

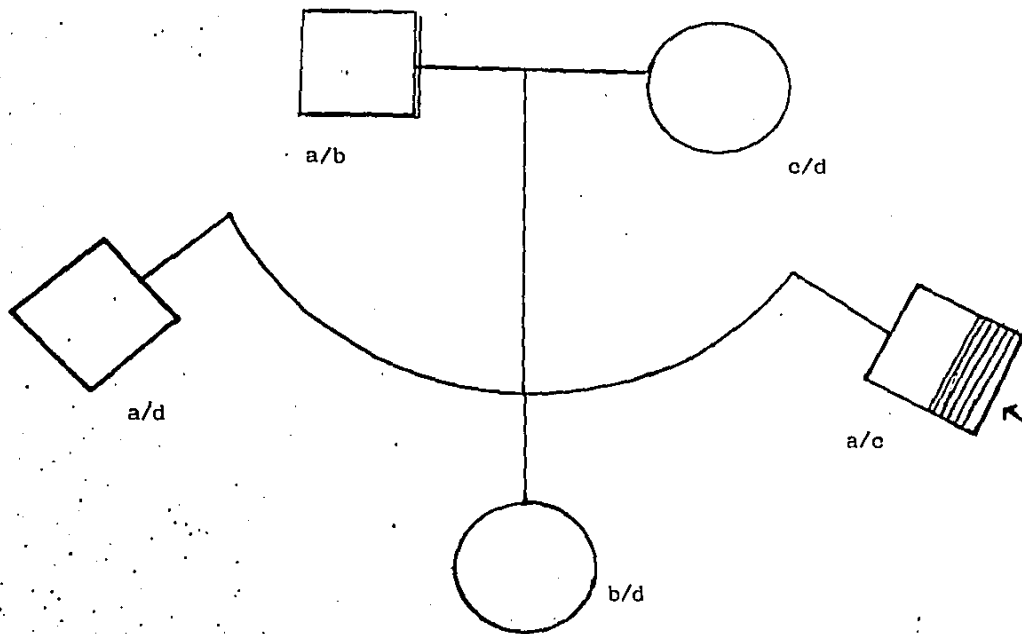


- A) A1 B8 DR3 SC42 DQ2 DRw52
- B) A2 B35 DR1 SC30 DQ1 DRwX
- C) A1 B12 DR4 FC31 DQ3 DRw53
- D) A11 B51 DR6 SC01 DQ1 DRw52

141

FIGURA # 18

FAMILIA No.8



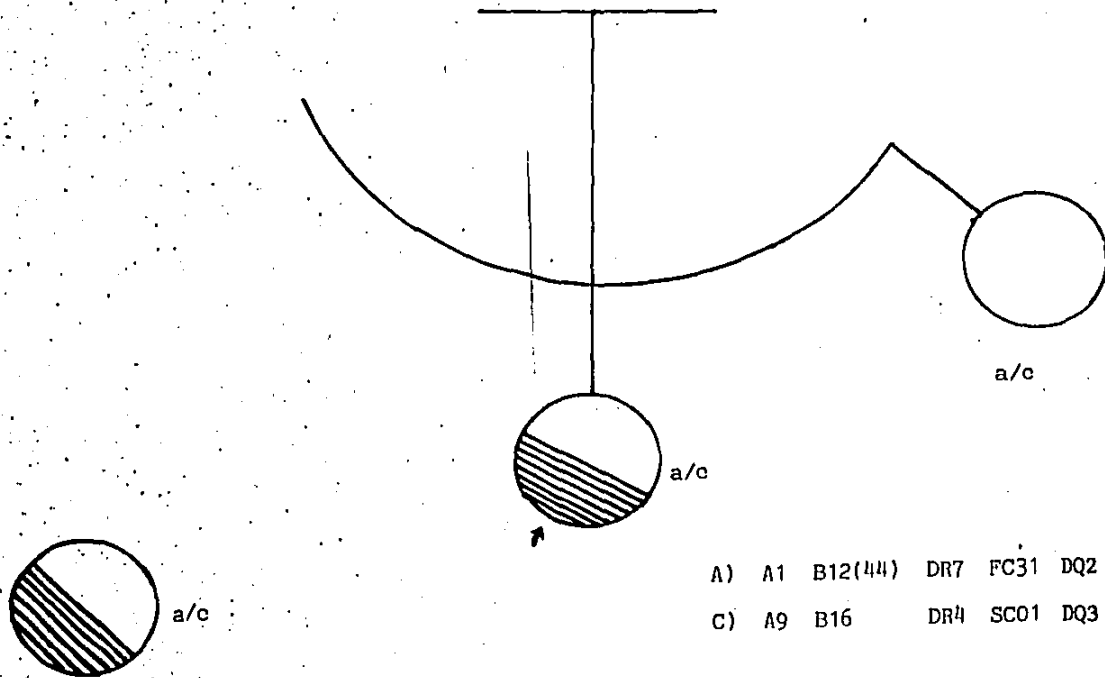
AR

- A) A2 B50 DR4 SC31 DQ3 DRw53
- B) A28 B62 DR7 SC42 DQ2 DRw53
- C) A28 B40 DR7 SC42 DQ2 DRw53
- D) A11 B13 DR9 SC31 DQX DRwX

232

FIGURA # 19

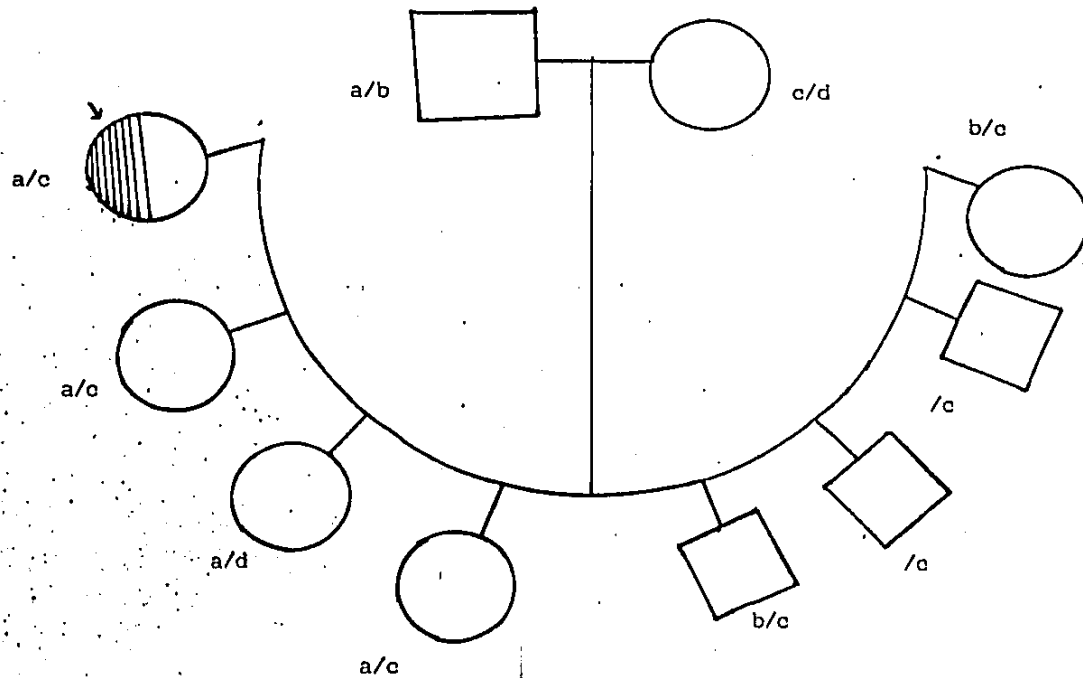
FAMILIA No.9



- A) A1 B12(44) DR7 FC31 DQ2 DRw53
- C) A9 B16 DR4 SC01 DQ3 DRw53

FIGURA # 20

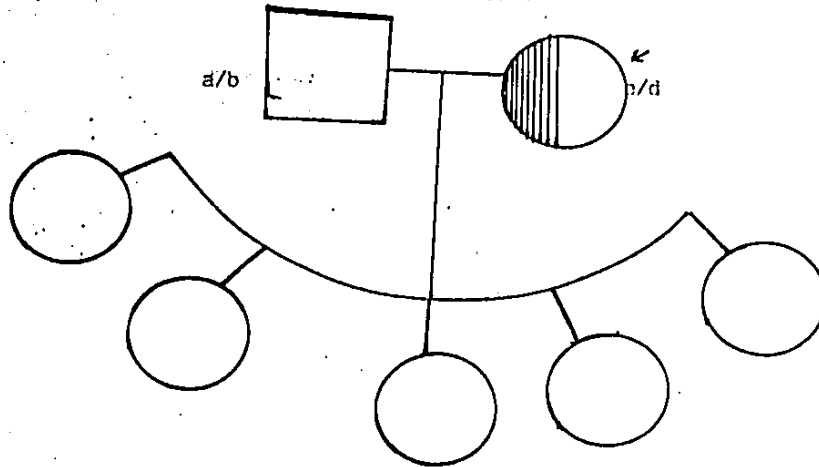
FAMILIA No. 10



- A) A9 B15 DR4 SC31 DQ3 DRw53.
- B) A2 B51 DR5 SC31 DQ3 DRw52
- C) A9 B39 DR4 SC31 DQ3 DRw51
- D) A2 B39 DR1 SC42 DQ1 DRwX

FIGURA # 21

FAMILIA No. 11



- C) A2 B51 DR3 SC31 DQ2 DRw52
- D) A9 B40 DR4 SC31 DQ3 DRw53

FIGURA # 22

FAMILIA No.12

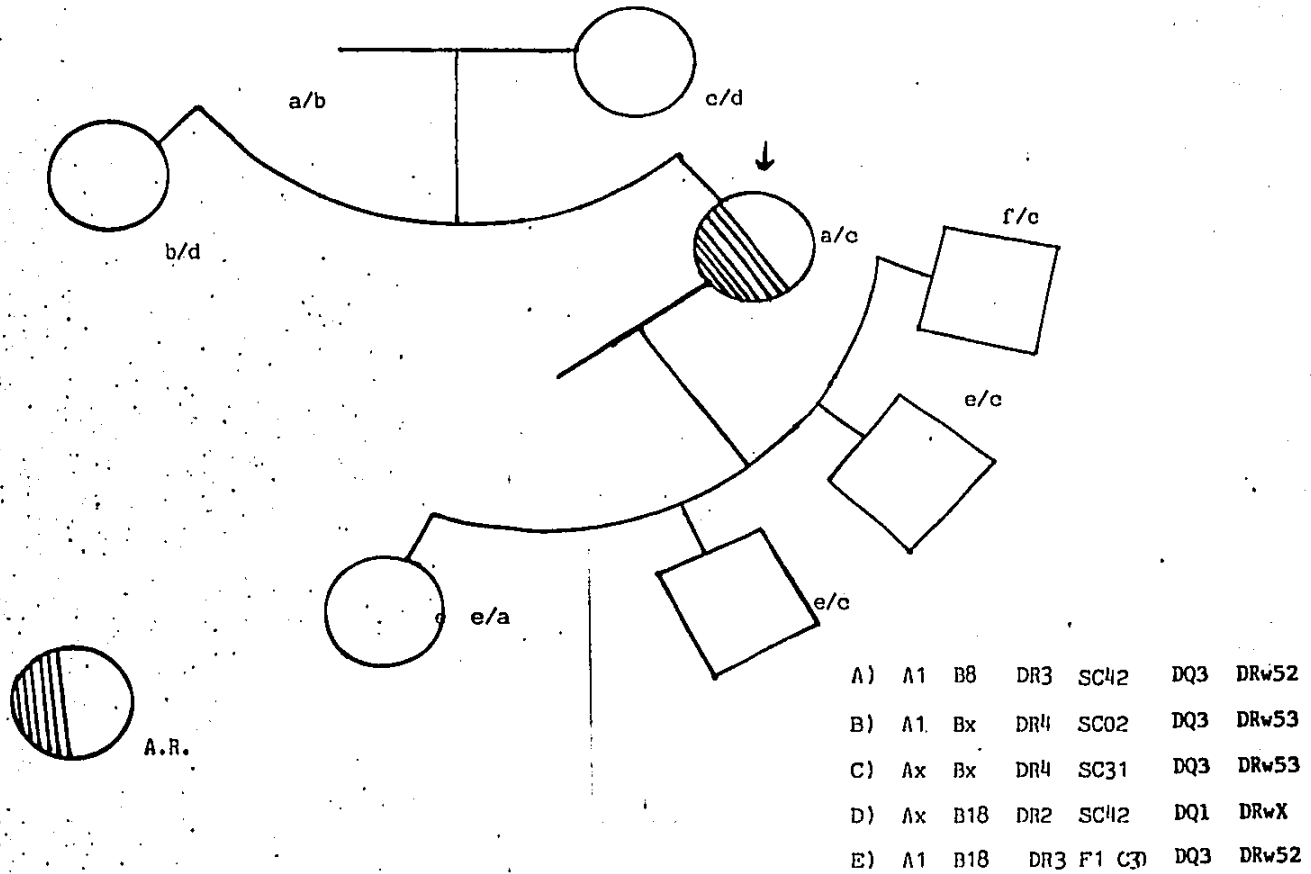
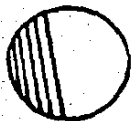
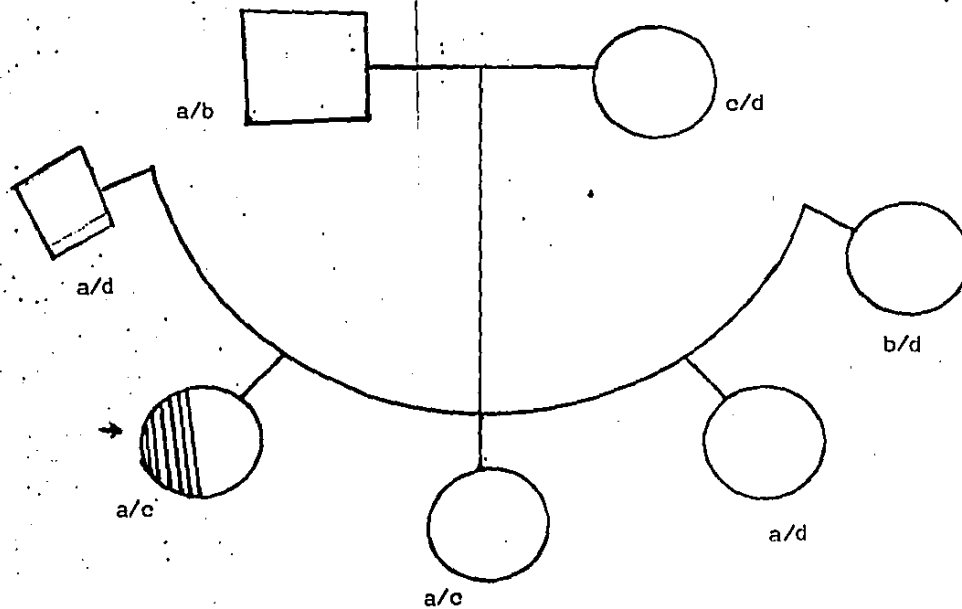


FIGURA # 23

FAMILIA No. 13

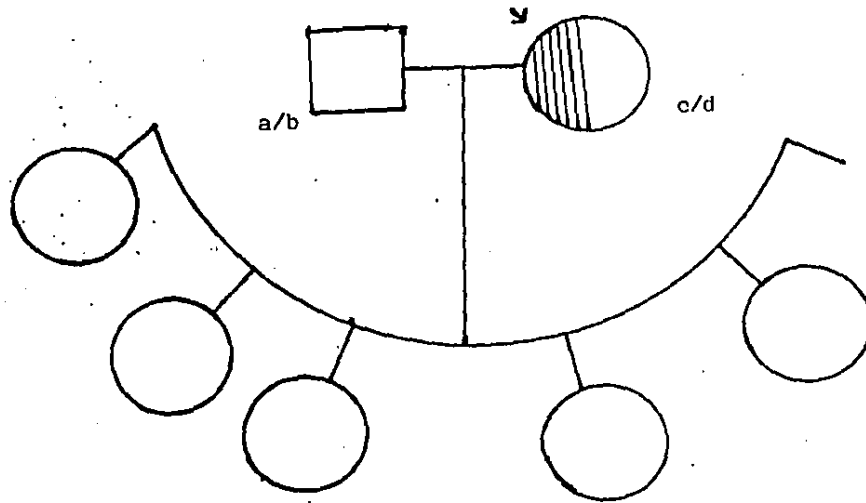


A.R

- | | | | | | | |
|----|-----|-----|-----|------|-----|-------|
| A) | A28 | B5 | DR4 | SC30 | DQ3 | DRw53 |
| B) | A1 | B5 | DR5 | SC31 | DQ3 | DRw52 |
| C) | A2 | B27 | DR7 | SC30 | DQ2 | DRw53 |
| D) | A11 | B40 | DR1 | SC31 | DQ1 | DRwX |

FIGURA # 24

FAMILIA No. 14

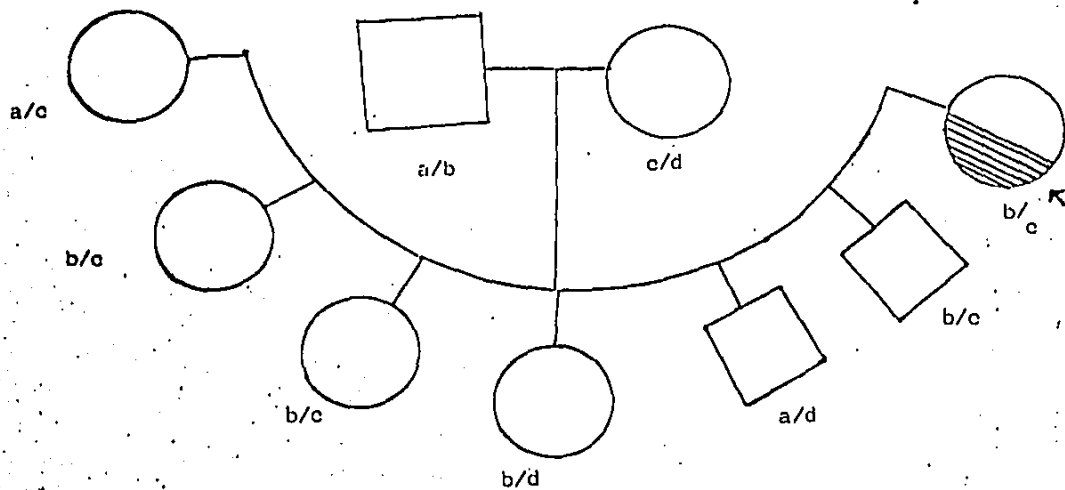


- C) A2 B39 DR4 SC31 DQ3 DRw53
- D) ~~A~~ B16 DR9 ~~SC~~11 DQX DRwX

246

FIGURA # 25

FAMILIA No. 15

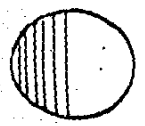
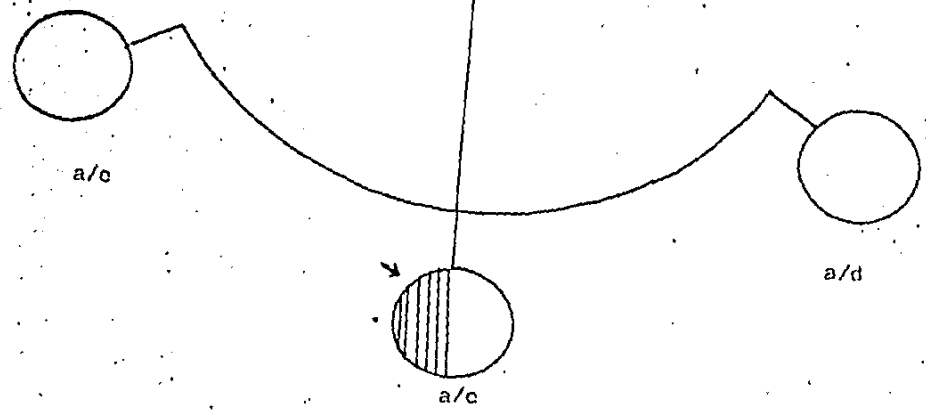


- | | | | | | |
|----|-----|-----|------|-----|-------|
| A) | B35 | DR4 | SC42 | DQ3 | DRw53 |
| B) | B5 | DR3 | SC30 | DQ3 | DRw52 |
| C) | B35 | DR2 | SC31 | DQ1 | DRwX |
| D) | B17 | DR4 | SC31 | DQ3 | DRw53 |

240

FIGURA # 26

FAMILIA No. 16

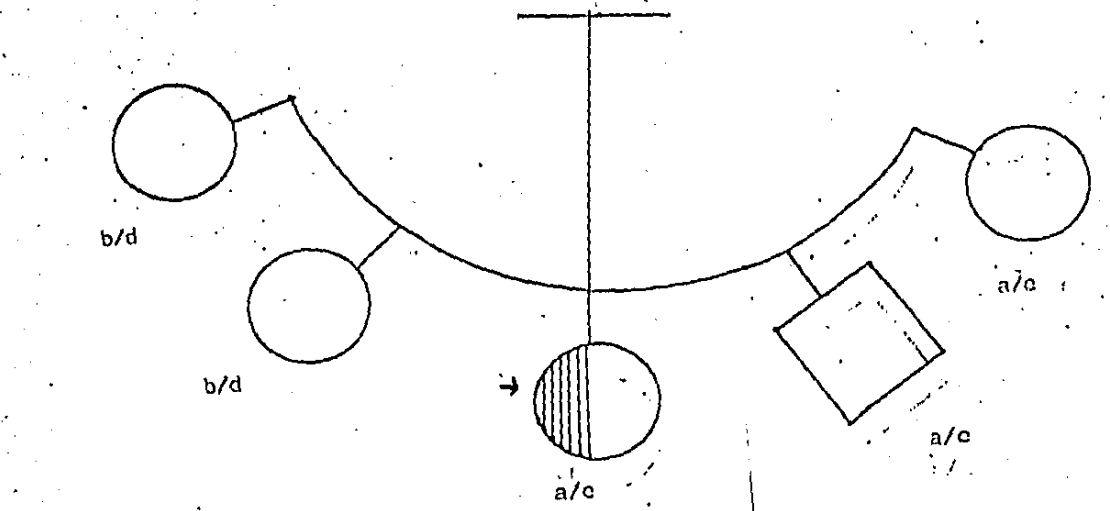


A.R.

A)	A28	B5	DR4	.DQw3	DRw53	SC31
B)						
C)	A3	B1B	DR7	DQ2	DRw53	SC01
D)	Ax	B7	DR5	DQ3	DRw52	—

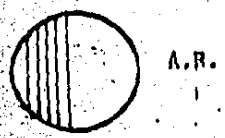
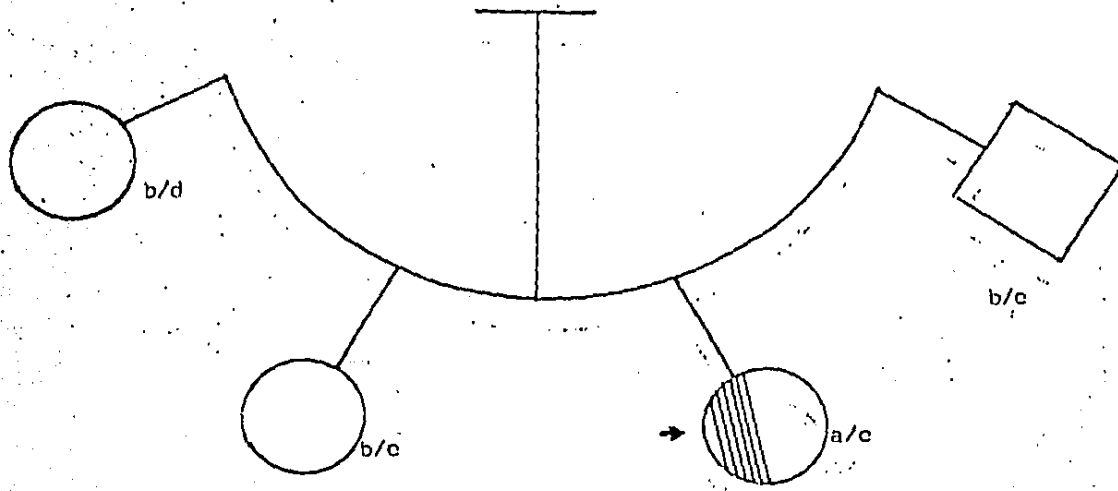
FIGURA # 27

FAMILIA No. 17



A)	A1	B17	DR5	FC32	DQ3	DRW53
B)	A2	B12	DR1	FC32,0	DQ1	DRWX
C)	A2	B11	DR4	FC01	DQ3	DRW53
D)	A28	B12	DR5	FC30	DQ3	DRW52

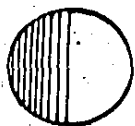
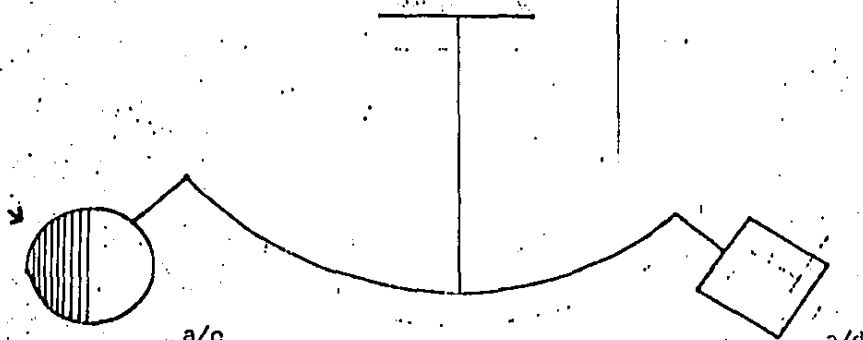
FIGURA # 28
 FAMILIA No. 18



A)	A1	B12	DR1	FC30	DQ1	DRwX
B)	A2	B18	DR4	SC31	DQ3	DRw53
C)	A1	B12	DR5	SC32	DQ3	DRw52
D)	A2	B15	DR8	SC42	DQX	DRw52

FIGURA # 29

FAMILIA No. 19

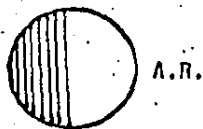
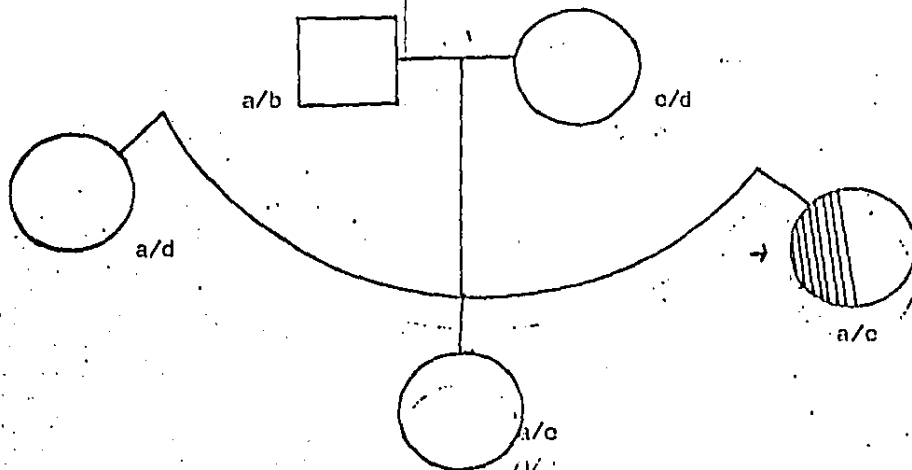


A.R.

A)	A1	B17	DR5	SC61	DQ2	DRw53
B)						"
C)	A1	B14	DR2	SC31	DQ1	DRwX
D)	A1	B35	DR7	SC31	DQ2	DRw53

FIGURA # 30

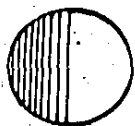
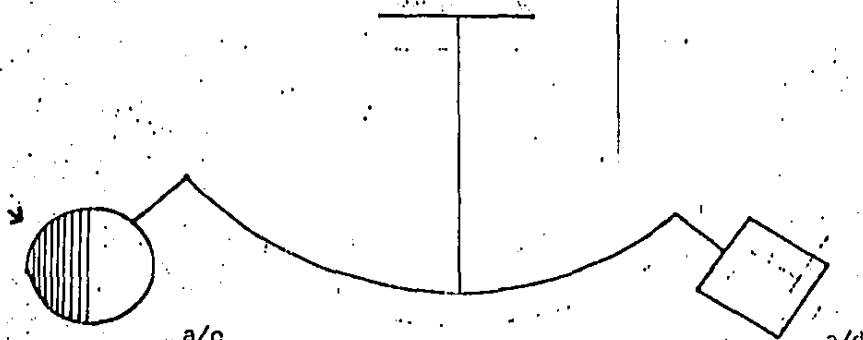
FAMILIA No. 20



A)	A2	B12(44)	DR7	FC31	DQ2	DRw53
B)	Ax	B27	DR5	SC11	DQ3	DRw52
C)	A9	B14	DR1	SC21	DQ1	DRwX
D)	A9	B5(51)	DR2	SC31	DQ1	DRwX

FIGURA # 29

FAMILIA No. 19

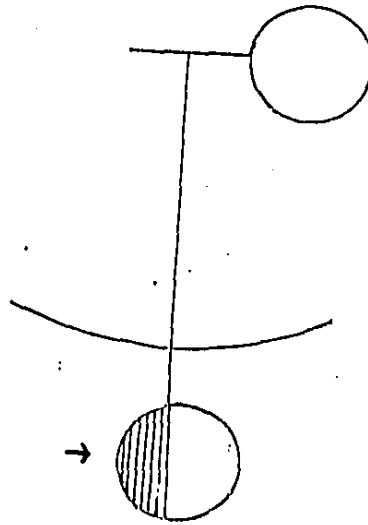


A.R.

A)	A1	B17	DR5	SC61	DQ2	DRw53
B)						"
C)	A1	B14	DR2	SC31	DQ1	DRwX
D)	A1	B35	DR7	SC31	DQ2	DRw53

FIGURA # 32

FAMILIA No. 22



c/d

a/c

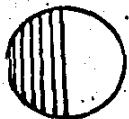
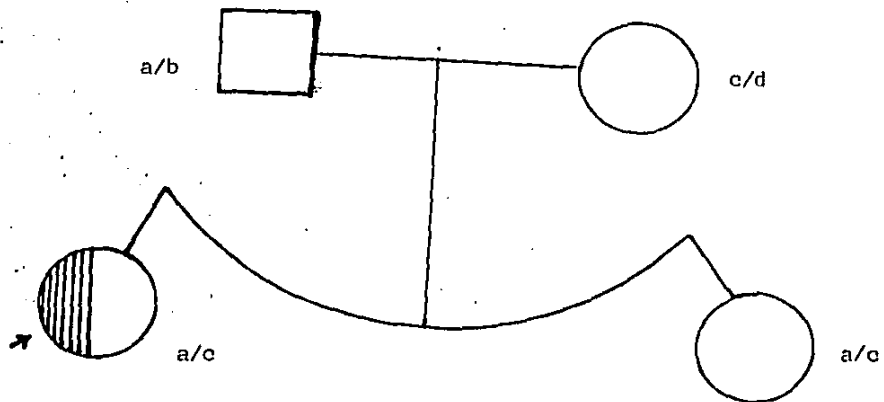


A.R.

- A) A1 B35 DR3 SC32 DQ3 DRW52
- B)
- C) A3 B35 DR5 SC6.1 DQ3 DRW52
- D) A1 B7 DR4 SC31 DQ3 DRW53

290

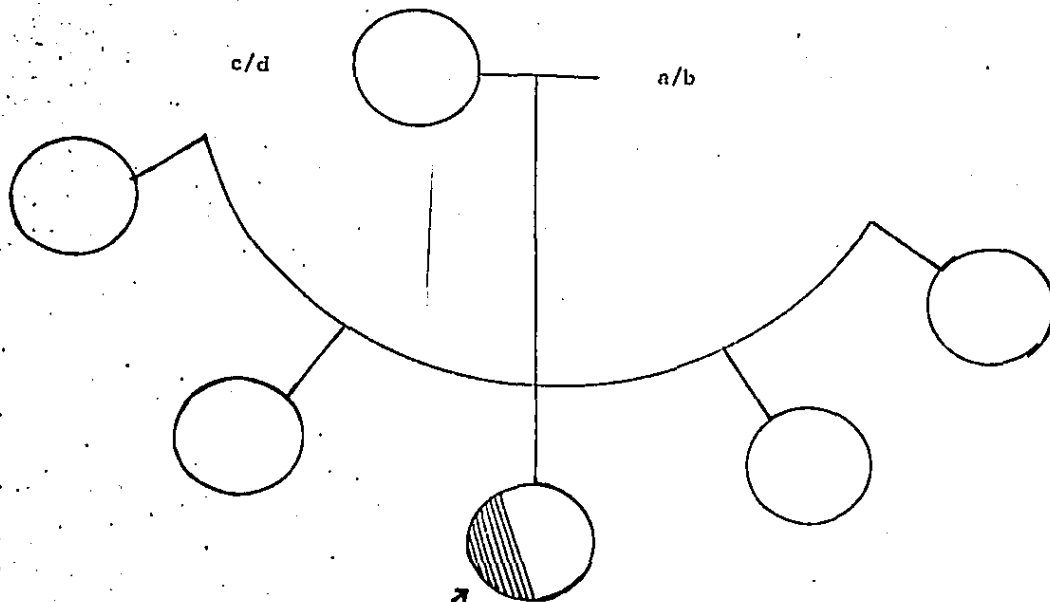
FAMILIA No. 23
GRAFICA 33



A. R.

- A) A1 B8 DR3 SC01 DQ2 DRw52
- B) A28 B7 DR7 SC31 DQ2 DRw53
- C) A1 B35 DR7 SC32 DQ2 DRw53
- D) A1 B16 DR6 SC30 DQ1 DRw52

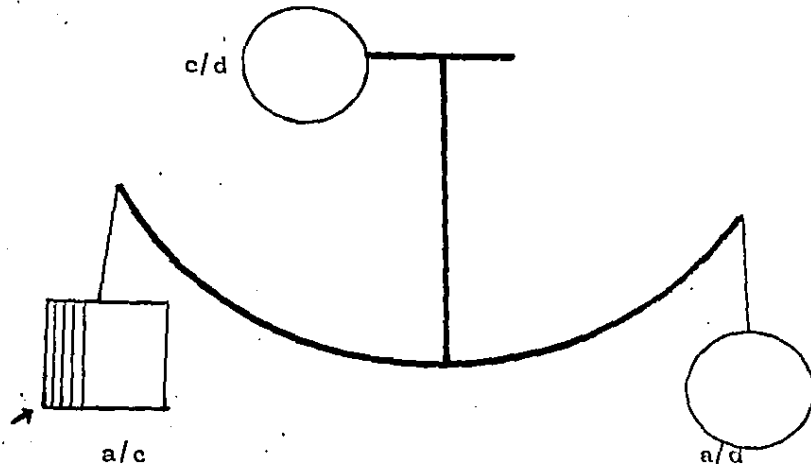
FAMILIA # 24
GRAFICA # 34



a/r

- a) A_2B_{12} DR4 DQ3 DRW53 SC31
- b) A_9B_5 DR4 DQ3 DRW53 SC31
- c) A_2B_{14} DR1 DQ1 DRWX SC31
- d) A_1B_{15} DRX SC31

GRAFICA No. 35
FAMILIA NO. 25



- a) A1 B8, DR7 DQ2 DRw53 SC42
- c) A2 B35 DR4 DQ3 DRw53 SC32
- d) DR5 SC31



AR

BHAPLOTIPOS AFECTADOS POR AR

CUADRO # 8

FAMILIA	A	B	DR	DQ	DRW	FB	C2	C4A	C4B
13	28	5	4	3	53	F	C	3	0
13	2	27	7	2	53	F	C	3	0
1	9	16	4	3	53	S	C	4	2
1	10	39	4	3	53	S	C	4	2
5	2	5	5	3	52	S	C	2	0
5	2	12	4	3	53	S	C	3	2
4	1	8	3	2	52	F	C	3	0
4	X	15	2	1	X	F	C	3	1
7	1	8	3	2	52	S	C	4	2
7	1	12	4	3	53	F	C	3	1
7	11	51	6	1	52	S	C	0	1
24	2	12	4	3	53	S	C	3	1
24	1	15	X	X	X	S	C	3	1
24	9	5	4	3	53	S	C	3	1
3	2	12	4	3	53	F	C	0	1
3	2	12	7	2	53	F	C	3	1
3	9	40	3	2	52	S	C	3	1
6	1	51	4	3	53	S	C	3	1
6	1	X	5	1	52	F	C	3	0
6	28	40	3	3	52	F	C	0	1
10	9	15	4	3	53	S	C	3	1
10	9	39	4	3	53	S	C	3	1
9	1	12	7	2	53	F	C	3	1
9	9	16	4	3	53	F	C	0	1
17	1	17	5	3	52	F	C	3	2
17	2	41	4	3	53	F	C	0	1
20	2	44	7	2	53	F	C	3	1
20	9	14	1	1	X	S	C	2	1
16	28	5	4	3	53	S	C	3	1
16	3	18	7	2	53	S	C	0	1
21	28	18	4	3	53	S	C	3	1
21	28	51	5	3	52	S	C	3	1
19	1	17	5	3	52	S	C	6	1
19	1	14	2	1	X	S	C	1	1
2	1	X	5	3	52	F	C	3	1
2	1	14	1	1	X	F	C	2	2

HAPLOTIPOS AFECTADOS POR AR

CUADRO #9

FAMILIA	A	B	DR	DQ	DQw	FB	C2	C4A	C4B
15	X	5	3	2	52	S	C	3	0
15	2	40	2	1	X	S	C	3	1
18	1	12	1	1	X	F	C	3	0
18	1	12	5	3	52	S	C	3	2
22	1	35	3	2	52	S	C	3	2
22	3	35	5	3	52	S	C	6	1
23	1	8	3	2	52	S	C	0	1
23	1	35	7	2	53	S	C	3	2
25	1	8	7	2	53	S	C	4	2
25	2	35	4	3	53	S	C	3	2
8	2	50	4	3	53	S	C	3	1
8	28	40	7	2	53	S	C	4	2
12	1	8	3	2	52	S	C	4	2
12	X	X	4	3	53	S	C	3	1
14	2	39	4	3	53	S	C	3	1
14	X	16	9	4	X	S	C	1	1
11	2	51	3	2	52	S	C	3	1
11	9	40	4	3	53	S	C	3	1
N=	54	54	54	54	54	54	54	54	54

* Suma de los cuadros #8 y #9

HAPLOTIPOS FAMILIARES NO AFECTADOS POR AR

CUADRO #10

FAMILIA	B	B	DR	DQ	DRW	FB	C2	C4A	C4B
13	1	5	5	3	52	S	C	3	1
13	11	40	1	1	X	S	C	3	1
1	28	7	4	3	53	S	C	0	1
1	9	12	8	X	52	S	C	3	1
5	3	X	2	1	X	S	C	3	1
5	28	27	1	1	X	S	C	3	1
7	2	35	1	1	X	S	C	3	0
24	2	14	1	1	X	S	C	3	1
3	2	7	X	X	X	F	C	0	1
6	9	41	5	3	52	F	C	0	1
10	2	51	5	3	52	F	C	3	1
10	2	39	1	1	X	F	C	4	2
17	2	12	1	1	X	F	C	3	2,0
17	28	12	5	3	52	S	C	1	1
20	X	27	5	3	52	S	C	1	1
20	9	5	2	1	X	S	C	3	1
16	X	7	5	3					
21	3	18	1	1	X	S	C	3	0
21	X	18	2	1	X	S	C	3	1
19	1	35	7	2	53	S	C	3	1
2	3	40	1	1	X	S	C	3	2,0
2	1	17	7	2	53	S	C	3	1
15	1	35	4	3	53	S	C	4	2
15	X	17	4	3	53	S	C	3	1
18	2	18	4	3	53	S	C	3	1
18	2	15	8	X	52	S	C	3	2
22	1	7	4	3	53	S	C	3	1
23	28	7	7	2	53	S	C	3	1
23	1	16	6	4	X	S	C	3	0
5	X	X	5	X	X	S	C	3	1
8	28	15	7	2	53	S	C	4	2
8	11	13	9	X	X	S	C	3	1
12	1	X	4	3	53	S	C	0	2
12	X	18	2	X	X	S	C	4	2
12	X	18	3	2	52	F1	C	3	0
25			5			S	C	3	1
N =	35	35	36	35	34	35	35	35	35

HAPLOTIPOS CONTROL

CUADRO #11

A	B	DR	DQ	DRW	FB	C2	C4A	C4B
12	40	8			S	C	4	2
10	14	1			S	C	0	1
1	8	3			S	C	0	1
1	39	2			S	C	3	1
1	51	2			F	C	3	1
2	35	8			S	C	3	1
2	40	8			S	C	3	1
9	39	4			S	C	0	1
2	12	7			S	C	0	1
9	39	7			S	C	3	1
28	39	7			S	C	3	1
28	49	10			S	C	3	1
2	H1	4			S	C	2	1
28	40	4			S	C	3	1
2	39	2			S	C	3	1
10	12	1			S	C	3	1
19	18	3			F1	C	3	0
19	14	1			S	C	3	1
28	39	3	2	53	F1	C	2	3
2	35	4			S	C	3	1
9	12	4			F	C	2	1
19	13	7			S	C	3	1
19	14	4	2	53	S	C	0	1
2	39	2			S	C	3	1
2	35	8			S	C	1	1
28	39	5			S	C	3	1
9	7	2			F	C	0	1
28	16	8			S	C	3	2
29	12	7			F	C	0	1
9	40	4			S	C	3	1
28	16	8			S	C	3	2
2	35	8			S	C	4	2
28	40	4			S	C	3	1
2	15	8			S	B	4	2
2	35	8			S	C	3	1
2	15	8			S	C	0	1
2	15	8			S	B	4	2

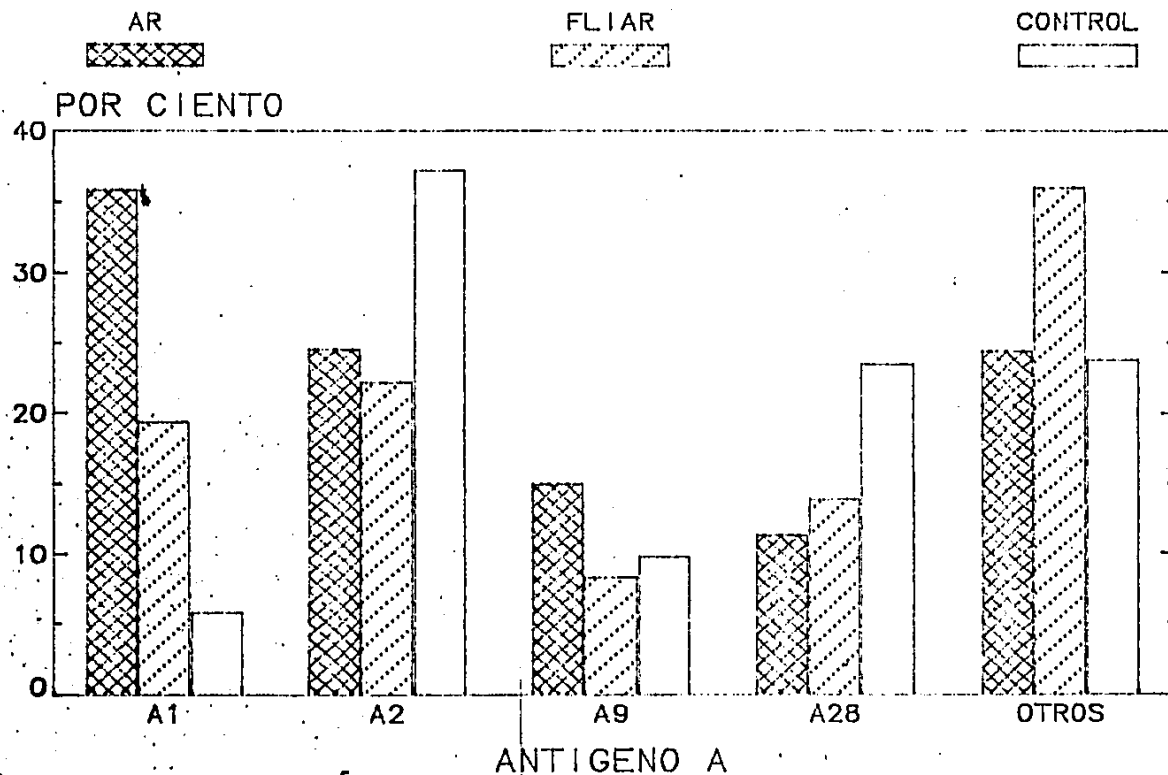
HAPLOTIPOS CONTROL
CUADRO 12

A	B	DR	DQ	DRw	FB	G2	C4A	C4B
2	35	4			S	C	3	1
2	16	2			S	C	3	1
2	16	2			S	C	3	1
28	41	5			S	C	3	1
X	39	4			S	C	1	1
2	48	6			S	C	2	1
31	39	4			F	C	3	3
28	15	4			S	C	3	1
28	14	1			S	C	0	1
10	34	4			S	C	2	1
2	35	8			S	B	3	4
5	39	4			S	C	1	1
28	41	5			S	C	3	1
11	35	1			S	C	4	2
N*=51	51	51	2	2	51	51	51	51
+								

N* Suma-de-los cuadros #11 y 12

FIGURA 36

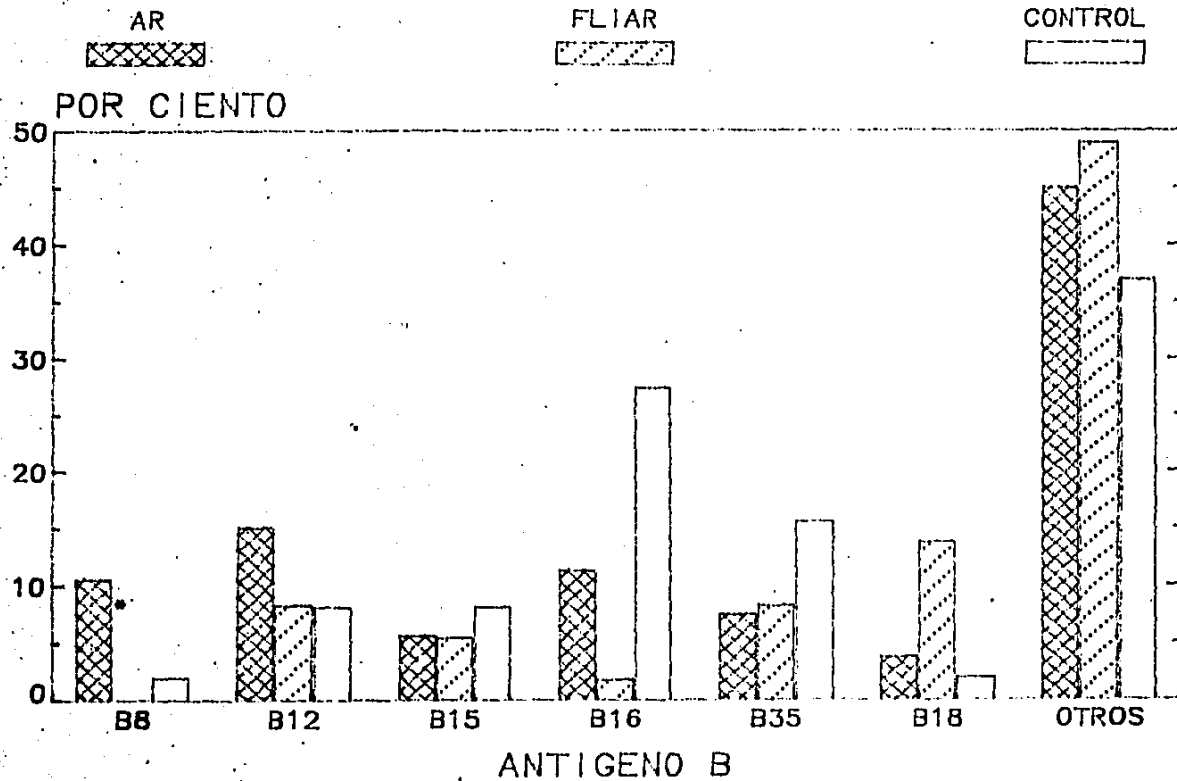
FRECUENCIA DEL ANTIGENO A EN AR, FLIARES Y CONTROLES



* AR VS FLIAR + CONTROL $P < 10^{-6}$

FIGURA 37

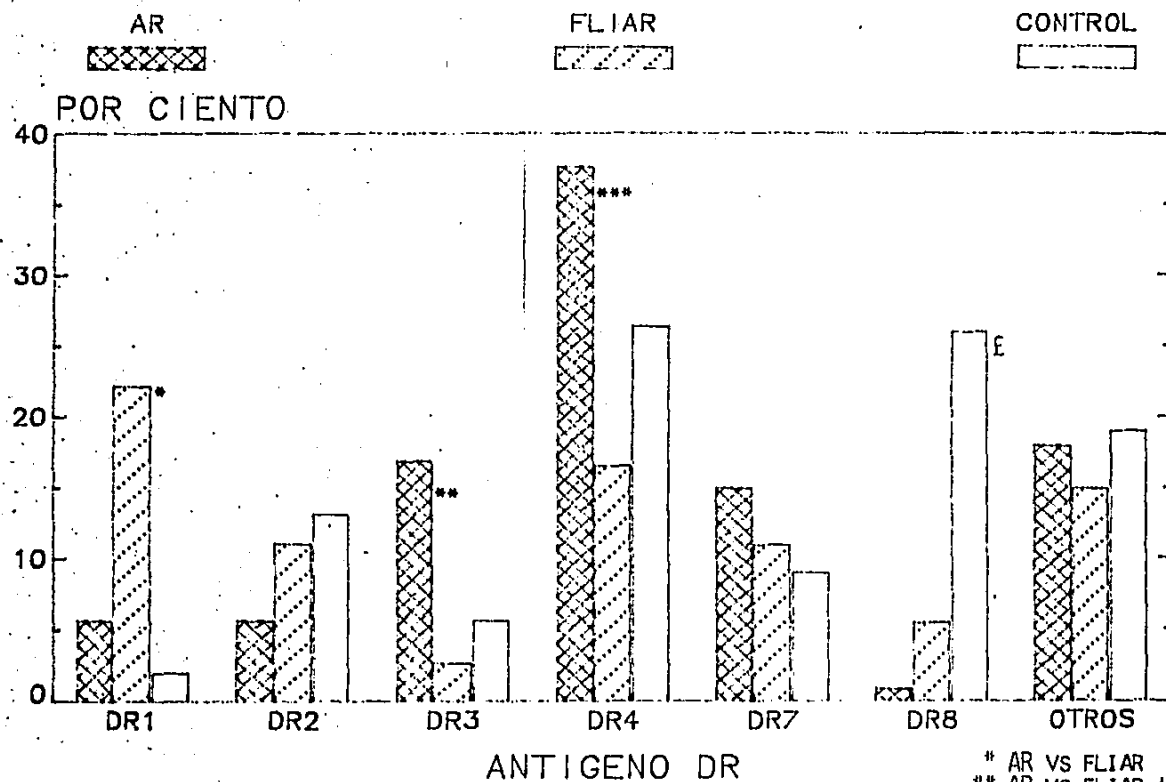
FRECUENCIA DEL ANTIGENO B EN AR, FLIARES Y CONTROLES



* AR VS CONTROL + FLIAR $P < 0.025$

FIGURA 38

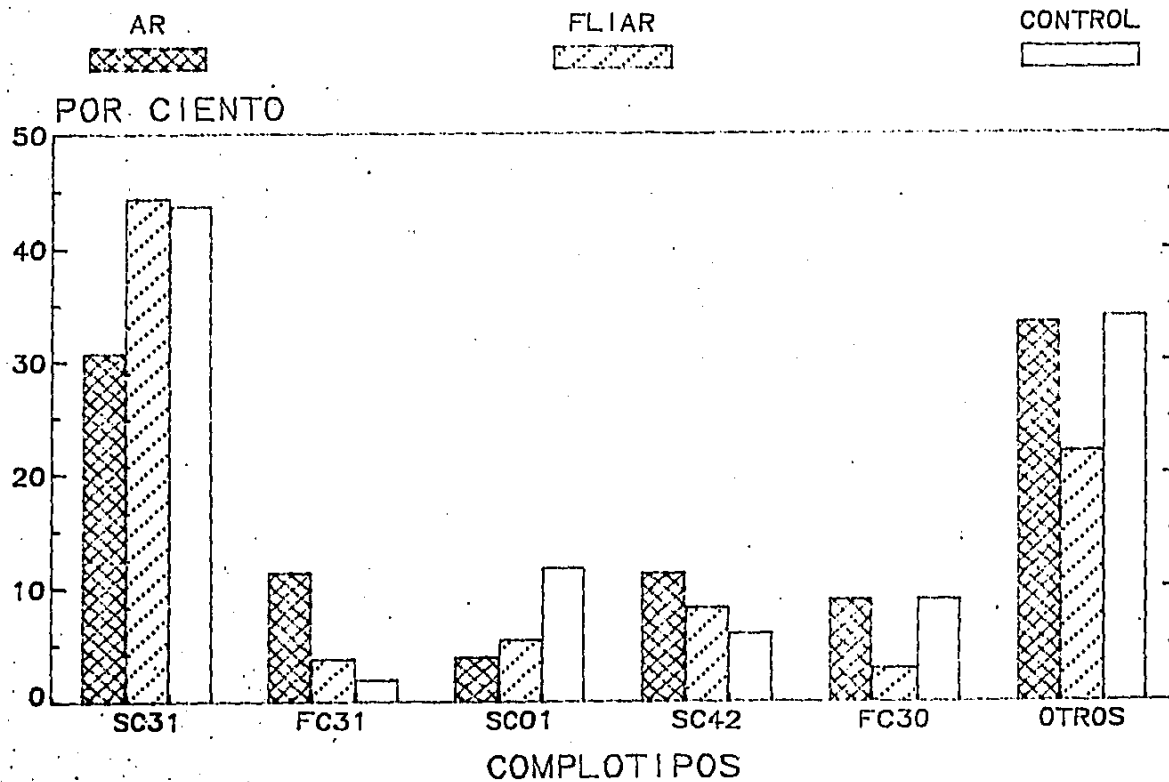
FRECUENCIA DEL ANTIGENO DR EN AR, FLIARES Y CONTROLES



* AR VS FLIAR P < 0,025
 ** AR VS FLIAR + CONTROL P < 0,025
 *** AR VS FLIAR P < 0,025
^E AR VS FLIAR + CONTROL P < 10⁻⁶

FIGURA 39

FRECUENCIA DE LOS COMLOTIPOS EN AR, FLIAR Y CONTROLES



ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

CUADRO # 13 ² X Y SIGNIFICANCIA ESTADISTICA DE LOS ANTIGENOS ,
RIESGOS RELATIVOS DE ANTIGENOS DEL MHC PARA AR

ANTIGENO	P Vs F		P Vs C		P Vs F+C		RR
	X ²	P	X ²	P	X ²	P	
A1	2.80	--	13.99	⁻⁵ 5X10 ⁻⁵	164.2	⁻⁶ 1X10 ⁻⁶ **	2.3
H8	3.59	--	2.51	--	5.35	0.025	8.7
DR1	5.42	0.025	0.88	--	0.5	---	--
DR3	4.36	0.05	3.38	--	6.22	0.025	4.3
DR4	4.6	0.05	1.5	--	3.82	--	3.4
DR8	3.04	--	16.3	0.001	52.0	⁻⁶ 10*	--
DRW53	5.05	0.025	DI	DI	DI	DI	2.8
FB*F	5.9	<0.025	7.7	<0.01	35.7	⁻⁶ <10 **	--
C4AQ0	3.15	--	4.2	0.05	4.19	0.05	--

Pc < 1.75 x 10⁻³

* Pc < 3.5 x 10⁻⁴ "efecto protector"

** Pc < 3.5 x 10⁻⁴

-- NO SIGNIFICATIVO

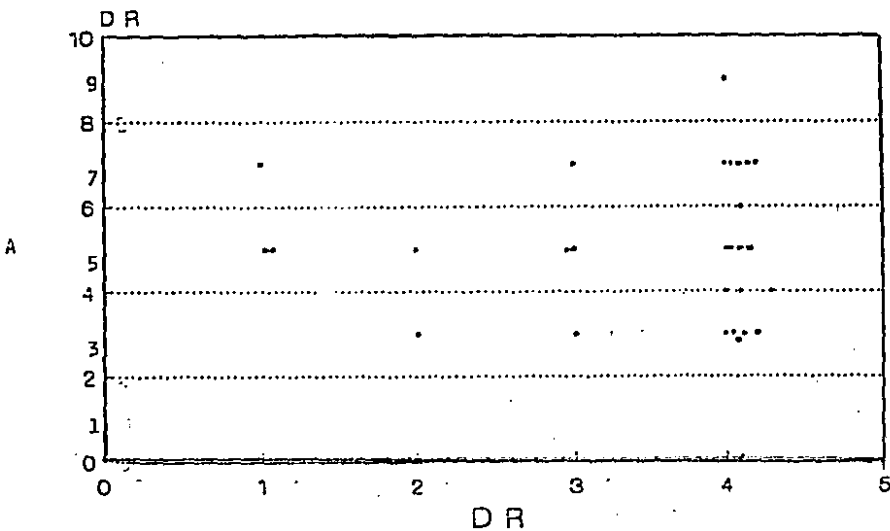
DI DATOS INSUFICIENTES

CUADRO #14 LISTA DE HAPLOTIPOS DE LOS PACIENTES EN BASE A LOS
HLA-DR MAS FRECUENTES

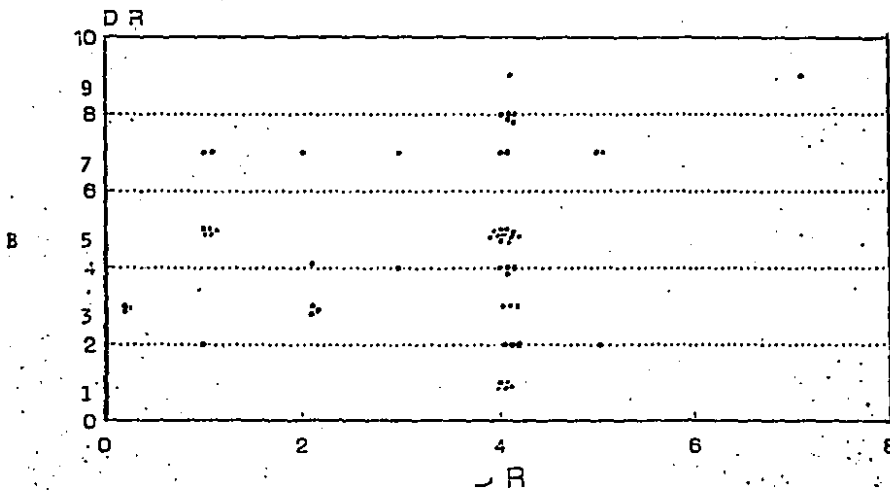
B	DR	COMPLOTIPO	#	B	DR	COMPLOTIPO	#
5	4	SC31	3	16	4	SC42	3
12	4	FC31	1	12	4	SC31	1
12	4	SC32	1	12	4	FC01	1
15	4	SC31	1	41	4	FC01	1
18	4	SC31	1	35	4	SC32	1
50	4	SC31	1	X	4	SC31	1
8	3	FC30	1	8	3	SC42	1
8	3	SC01	1	40	3	SC31	1
40	3	FC01	1	5	3	SC30	1
35	3	SC32	1	12	7	FC31	2
18	7	SC01	1	35	7	SC32	1
8	7	SC42	1	40	7	SC42	1

FIGURA 40

FENOTIPOS DR PACIENTES



FENOTIPOS DR FAMILIARES



DISCUSION

Es importante el hecho de que 35% de los pacientes con AR tienen el HLA-A1 en contraposición a lo encontrado en la población normal mexicana que fué de 10% ($P < 3.5 \times 10^{-4}$). Este antígeno es igualmente raro en la población indígena mexicana, y probablemente, refleja mezcla genica, ningún otro alelo de este locus fué diferente en los tres grupos a comparar.

Con respecto al HLA-B resalta la proporción elevada del antígeno B8 que no se encuentra en los familiares estudiados y su frecuencia en la población normal es muy baja coincidiendo con la reportada en otros estudios realizados en mexicanos. También es importante el hecho de que el 15% de los pacientes fué HLA-B12 que al compararlo con los otros dos grupos no resultó significativo, esto probablemente se deba al polimorfismo particularmente alto de este locus. Otro antígeno importante es el B15, reportado con mayor frecuencia en caucasicos, en este estudio en particular no presentó, diferencias con familiares y controles, demostrando con ello, que se debe tener en cuenta la genética de población, en este tipo de estudios. En mexicanos se deben generar datos propios para conocer la predisposición genética de enfermedades, ya estudiadas en otros grupos humanos. Finalmente el HLA-B16 que es muy común en la población normal mexicana aquí resultó en una disminución de su frecuencia, aun cuando ésta no fué estadísticamente significativa probablemente, por el tamaño de la muestra.

Especial atención merece el análisis de los antígenos de las moléculas clase II, ya que se encontraron diferencias importantes en varios de ellos, En primer lugar, el DR4 es un antígeno que si bien ya se conoce que está aumentado en la mayoría de las poblaciones, en los mexicanos es el antígeno mas frecuente del HLA-DR en la población normal, y al resultar estadísticamente significativo cuando se compara con los familiares consolida la noción, de que en los individuos que lo poseen reside el factor genético mas importante para el desarrollo de esta enfermedad, principalmente, porque este antígeno rebasa las barreras étnicas; y segundo, porque mundialmente la población mexicana es de los grupos donde el DR4 es mas frecuente. Este hecho sugiere, también, que los mexicanos es un grupo idóneo para investigar el papel de los subtipos de DR4 en la salud y enfermedad. Ya que la población mestiza mexicana, tiene 56% de genes indígenas (Lisker y col) y la frecuencia del DR4 en indígenas es mas alta que en todos los grupos hasta ahora estudiados incluyendo la población aquí analizada. Los resultados de este estudio sugieren la participación del cromosoma homólogo en los individuos DR4, ya que a pesar de la alta frecuencia de este antígeno la de homocigotos para él es inferior a la esperada de hecho solo 3/28 pacientes son homocigotos, Es interesante lo encontrado en los tres varones aquí incluidos, se sabe que la AR se presenta con mayor frecuencia en la mujer, y estos tres pacientes tuvieron en su cromosoma homólogo 2 (DR4/DR7) y 1 (DR4/DR4) y se conoce que estos antígenos están en desequilibrio genético con otra molécula clase

II que es el HLA-DRw53 el cual fué significativo pero al corregirse la ($p < 0.025$) la interpretación de estos datos sugiere que existe además de una complementación genica en las moléculas del MHC en los hombres un efecto aditivo de genes para que la penetrancia del gen en el medio ambiente se logre expresar clínicamente esto apoya la etiología multifactorial de la enfermedad.

Otros haplotipos no DR4 incrementados de manera significativa, fueron DR3, de hecho 18% de los pacientes tuvieron el fenotipo DR3/DR4 el cual está asociado con diferentes formas de autoinmunidad en distintas poblaciones (Diabetes insulino dependiente tipo I, Penfigus vulgaris). Este fenotipo estuvo asociado a pacientes que tuvieron desarrollo de toxicidad severa al uso de medicamentos inductores de remisión clínica, el número fue pequeño y no se analizó estadísticamente pero, en caucásicos existen reportes de asociación de toxicidad a este tipo de drogas, probablemente este grupo creó un sesgo en nuestros resultados y tendría que ampliarse el estudio para confirmar los datos aquí obtenidos.

Algunos antígenos no fueron frecuentes, tal es el caso del HLA-DR1 y el HLA-DR8. Es de señalar que el DR1 apareció con mayor frecuencia en los familiares sanos que en los enfermos probablemente debido a un supuesto "efecto protector", sin embargo, esto debe analizarse ya que existen reportes en judíos de origen Askenazi y en nativos de la India de asociación de este antígeno con AR. Los datos generados de las moléculas clase II, permiten especular de si la susceptibilidad en mexicanos es

por un epítopo que están compartiendo los individuos DR4 y DR7 (que se segregan en desequilibrio genético con el DRW53 y que puede estar creando con DRB1 y/o DRB4 una epítopo de susceptibilidad. Lee SH reportó un estudio en el que 93% de los pacientes con AR compartían una secuencia de aminoácidos reconocida por un anticuerpo monoclonal 109d6. Este estudio no define el origen étnico de los pacientes, sin embargo existen datos generados en el que en caucásicos hay un epítopo de susceptibilidad en DR1, DR4 denominada MC1 que reconoce la tercera región hipervariable de DR1 y Dw4 (subtipo de DR4 más frecuente 50% en AR.), es llamativo, que esta secuencia la comparte la proteína gp110 del virus del EBV (cuadro 14) al que se le ha atribuido un papel etiológico en AR(50). Respecto a la disminución del HLA-DR8 solo ocurre cuando se compara con los controles, lo que tiene varias implicaciones entre ellas, la dificultad para obtener antisueros de gran calidad que identifiquen con certeza este antígeno, y dada la reactividad cruzada dentro de las moléculas clase II patrocinada por el gran desequilibrio de ligamiento con DQ y el DR codificado por las cadenas DR-B1V y DR-B1II pudo producir este resultado. En este estudio en particular no se encontró "el efecto protector" del HLA-DR2 como se reporta en caucásicos.

Con respecto a los genes clase III al revisar la frecuencia por alelos, resalto el hecho de que en el gen del factor B el alelo F (FB*F) apareció con mayor frecuencia en los pacientes con AR que en los otros dos grupos ($p < 0.025$) lo que sugiere que

la mutación que dió lugar a esta variable electroforética confiere la producción de un aminoácido cuyo papel se desconoce aún. En el gen de C4 es interesante la frecuencia elevada del alelo nulo de C4A cuando se comparó con los controles ya que este alelo se ha visto incrementado en varias formas de autoinmunidad, sobre todo en las relacionadas con la depuración deficiente de complejos inmunes. Su presencia en el grupo de pacientes con AR probablemente se debe a que algunos pacientes son de los que hicieron toxicidad a medicamentos inductores de remisión, también que el alelo nulo está en desequilibrio con los antígenos del HLA A1, B8, DR3 que como ya se señaló también estuvo incrementado en este grupo de pacientes por lo que su asociación pudiera ser secundaria, si bien solo uno de los pacientes con el alelo nulo en C4A presentó el haplotipo extendido caucásico HLA- A1, B8, DR3, SC01, ya considerando los complejos como una unidad genética y en concordancia a lo referido del alelo F del factor B es congruente la elevación de los complejos FC30 y FC31, Es evidente una heterogeneidad genética en este estudio, cuando se analizaron los árboles genealógicos. Se debe tener en cuenta la participación del medio ambiente y otros genes que codifican para proteínas que influyen en la regulación de la respuesta inmune y pueden tener un papel importante en la aparición de la enfermedad. Es muy importante tener en cuenta que en estudios inmunogenéticos de población, similares a éste, el estudio clínico puede ser de utilidad en vista de la heterogeneidad de los padecimientos inmunes.

TEORIA DE
 LA EPITOPE COMPARTIDA
 CUADRO 15

AMINOACIDO	69	70	71	72	73	74	75	76	77
HLA-DR1	E	Q	R	R	A	A	V	D	T
HLA-Dw4	E	Q	K	R	A	A	V	D	T
HLA-Dw14	E	Q	R	R	A	A	V	D	T
HLA-Dw15	E	Q	R	R	A	A	V	D	T
	807								816
gp 110*	E	Q	K	R	A	A	Q	R	A

*glicoproteina de la capsida del virus del Epstein-Barr

Roudier J, 1988

TEORIA DE
LA EPITOPE COMPARTIDA
CUADRO 15

	AMINOACIDO	69	70	71	72	73	74	75	76	77
HLA-DR1	E	Q	R	R	A	A	V	D	T	
HLA-Dw4	E	Q	K	R	A	A	V	D	T	
HLA-Dw14	E	Q	R	R	A	A	V	D	T	
HLA-Dw15	E	Q	R	R	A	A	V	D	T	
		807								816
gp 110*	E	Q	K	R	A	A	Q	R	A	A

*glicoproteína de la capsida del virus del Epstein-Barr

CONCLUSIONES

1. Estos datos sugieren que en mexicanos la predisposición a artritis reumatoide asociada a HLA es conferida por mas de un gen localizado dentro del MHC.
2. Los genes MHC que asociados a artritis reumatoide en la molecula clase I y II son : A1, B8, DR3, DR4, DRW53.
3. Como en otras poblaciones el DR4 en mexicanos se asocio a artritis reumatoide, Los pacientes difirieron de sus familiares en el fenotipo dado por el alelo del cromosoma homologo.
4. El antígeno DRW53 codificado por DR alfa-betaIV esta participando en la susceptibilidad a artritis reumatoide.
5. En las moleculas clase III el FB*F y alelos nulos en C4A se encontraron significativamente en los pacientes indicando que estos pueden participar en la fisiopatogenia de la enfermedad

BIBLIOGRAFIA

1. Allen P.M. Antigen processing at the molecular level. *Immunol Today*, 1987;8:270.
2. Alper C.A. and Johnson a.M. Immunofixation electrophoresis: A thecnic the study of protein polymorphism. *Vox Sang*, 1969;57(1):1
3. Alper C.A., Boenisch T., and Watson L. Genetic polymorphism in Human glycine- rich beta-glycoprotein. *J Exp Med*, 1972; 135:68.
4. Alper C.A, Raum D., Karp S. Serum complement supergenes +of the major histocompatibility complex in man (complotypes) *Vox sang*,1983; 45:62.
5. Arakawa K.C., Luthra H.S., Handweger B.S., et al: Molecular and Serologic analysis of a unique family with rheumatoid arthritis. *Dis Markers*, 1988; 6:57.
6. Avila L.M., Granados J., Vargas G., et al: Complementacion genica en la artritis reumatoide de pacientes mestizos mexicanos sugerida por marcadores del brazo corto del cromosoma seis. Septima reunion de maestria y doctorado en biomedicina. Mexico DF,1988. p32.
7. Awdeh Z.L., and Alper C.A., Inherited structural polymorphism of the fourth component of human complement. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1980; 77:3576
8. Awdeh Z.L., Raum D., Alper C.A. Major histocompatibility complex (MHC) linked complement haplotypes (complotypes). *Fed Proc*,1981; 40:1066.
9. Bahr G.M., Rook A.W., Shahin A., et al: HLA-DR-associated isotype-specific regulation of antibody levels to mycobacteria in rheumatoid arthritis. *Clin exp Immunol*, 1988; 72:26.
10. Blake N.M., and Redford P.R. Detection of the chromosome 6 non-HLA genes products. In: Simons M.J., and Tait R.D. (eds): Detection of immune-associated genetic markers of human disease. 1984. Churchill Livingstone, 1984, 52.
11. Berdoz J., Gorski J., Termijtelen A.M., et al. Constitutive and induced expression of the individual HLA-DRBeta and alpha chain loci in different cell types. *J immunol*, 1987 139:1336.

12. Brighton W., De la Harpe A.L., Staden D.J., et al: The prevalence of rheumatoid arthritis in a rural african population. *J Rheumatol*, 1988; 15:405
13. Carpenter B.A., Kahl L.E., Bartkowiak C.D., Duquesnoy R.J., et al: Adult rheumatoid arthritis is associated with MC1, a new HLA-D encoded determinant. *J Rheumatol*, 1988; 15:39.
14. Condeelis J.J., The autoimmune diseases. *JAMA*, 1987, 258: 2920
15. Cush J.J., Lipsky P. The immunopathogenesis of rheumatoid arthritis : the role of cytokines in chronic inflammation. *Clin Aspects autoimmunity*, 1987;1:2
16. Del Junco D., Luthra H., Annegers J., Et al: The aggregation of rheumatoid arthritis an its relationship to the HLA-DR4 association. *Am J Epidemiol*, 1984; 119:813.
17. De Jongh B.M., Van Romunde K.J., Valkenburg H.A., et al: Epidemiological study of HLA and GM in rheumatoid arthritis and related symptoms in an open dutch population . *Ann Rheum Dis*, 1984; 43:613.
18. Dupont B. Immunobiology of HLA Nomenclature committee/ Dupont B. Ed . Springer Verlag . N Y ,1987;pp1.
19. Duquesnoy R.J., Marrari M, Hackbarth D. and Zeevi A.: Serological and cellular definition of a new HLA-DR associated determinant, MC1, and its association with rheumatoid arthritis. *Hum Immunol*, 1984; 10:165.
20. Fawcett M.C., Walker D.J. and Griffiths I.D. Demonstration of impaired T cell regulation of Epstein-Barr virus stimulated B lymphocytes in rheumatoid arthritis with HLA identical, disease discordant sibling pairs. *Ann Rheum Dis*, 1988; 47:372.
21. Festenstein H., Awad J., Hitman G., et al: New HLA DNA polymorphisms associated with autoimmune diseases. *Nature*, 1986; 322:64 .
22. Ferraccioli G. and Savi M. Association between DR antigens, rheumatoid arthritis with and without extraarticular features and systemic lupus erythematosus in northern italy. *J Rheumatol*, 1988; 15:51.
23. Firestein G.S. Tsai V, Zvaifler N.J. Cellular immunity in the joints of patients with rheumatoid arthritis and other forms of chronic synovitis . *Rheum Dis Clinics N A*, 1987; 13:191.

24. Germain R.N. The ins and outs of antigen processing and presentation. *Nature*, 1987 ;322: 687.
25. Gorski J. and Mach B. Polymorphism of human Ia antigens: gene between two DR loci results in a new HLA-D/DR specificity. *Nature*, 1986; 322:67.
26. Grennan D.M. and Dyer P.A.: Immunogenetics and rheumatoid arthritis. *Immunol Today*, 1988; 9:33
27. Gregersen P.K., Shen M., Song Q., et al: Molecular diversity of HLA-DR4 haplotypes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986; 83:2642.
28. Griffin A.J. Wooley P., Panayi G.S. and Batchelor J.R. HLA-DR antigens and disease expression in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 1984; 43:218 .
29. Howell W.M., Evans P.R., Spellerberg M., et al: An HLA-DQbeta associated restriction fragment length polymorphism in rheumatoid arthritis. *Dis Markers*, 1988; 6:58.
30. Khan M.A., Reynolds T.L. Association of autoimmune disease with rheumatoid arthritis in families. *Dis Markers* 1988; 6:60.
31. Khan M.A., Yamashita T.S., Reynolds T.L. Genetic heterogeneity of familial rheumatoid arthritis (RA). *Dis Markers*, 1988; 6:62.
32. Klouda P.T., Corbin S.A., Hidwell J.L., et al: Felty's syndrome and HLA-DR antigens. *Tissue Antigens*, 1986; 17:112
33. Kurosaaka M., Ziff M: Immunoelectron microscopic study of the distribution of T cell subsets in rheumatoid synovium. *J Exp Med*, 1983; 158:1191
34. Lamm L.U., Petersen G.B. The HLA genetics linkage group. *Transp Procc*, 1979;4: 1692
35. Littman D.R. The structure of the CD4 and CD8 genes. *Ann Rev Immunol*, 1987; 5:561-584.
36. Mageed R.A., Jefferis R. Analysis of immunoglobulin variable region gene usage in rheumatoid factors: possible relationship to genetic predisposition to rheumatoid arthritis. *Dis Markers*, 1988; 6:59.

37. Malaviya A.N., Mehra N.K., Dasgupta B., et al: Clinical and immunogenetic studies in rheumatoid arthritis from norther India. *Rheum Int*, 1983; 3:105.
38. Mauff G., Bender K., and Fischer B., Genetics polymorphism of the fourth component of human complement. *Vox sang*, 1979; 34:296
39. McCusker C.T. and Singal D. Molecular relationships between the class II HLA antigens and susceptibility to rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*, 1988; 15:1050.
40. Heo T., Atkinson J.P., Bernoco M., et al. Structural heterogeneity of the C2 complement protein and its genetic variants in man: A new polymorphism of HLA region. *Proc Natl Sci USA*, 1977; 74: 1672
41. Nepom G.T., Holbeck S.L., Wilske K.R., et al: Identification of HLA-Dw14 genes in DR4+ rheumatoid arthritis. *Lancet* ii :1002.
42. Nunez G., Moore S., Ball G., et al: Study of HLA antigens in ten multiple-case rheumatoid arthritis families. *J Rheumatol*, 1984; 11:129.
43. Olaisen B., Tesberg P., et al. Human complement C4 locus is duplicated on same chromosome. *Nature*, 1979; 279: 736.
44. Panayi G.S., Wooley P. and Batchelor J.R. Genetic basis of rheumatoid disease: HLA antigens, disease manifestations, and toxic reactions to drugs. *Brit Med J* 1978; 2:1326.
45. Payami H. Genetics of rheumatoid arthritis . *Tissue Antigens*, 1986; 27:57.
46. Philips P. Infectious agents in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Sem Arthritis Rheum*, 1986; 16:1.
47. Perrier P., Raffoux C., Thomas Ph., et al: HLA antigens and toxic reactions to sodium aurothiopropanol sulphonate and D-penicillamine in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheu Dis*, 1985; 44:621.
48. Raum D., Awdeh Z., Glass D., et al: Extended haplotuyptes of chromosome 6 in adult rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 1984; 27:516.
49. Rodey G.E. History and nomenclature of the HLA system. Dawson, R.B. ed *HLA Typing: a technical workshop*. American association of the blood banks. San Francisco. Cal

62. Stanford J.L., Rook G.A., Bahr G.M., et al. HLA-DR and tuberculin tests in rheumatoid arthritis: evidence supporting a relationship between mycobacteria and the etiology of the disease. *Dis Markers*, 1988; 6:63.
63. Statsny P. Association of the E-cell alloantigen DR-4 with rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*, 1978; 298:869.
64. Statsny P., Myers L., Nunez G. et al: Molecular genetic and T cells in autoimmunity. *Ann N Y Ac Sci*, 1988.
65. Stockman A., Zilko P., Major G., et al: Genetic Markers in rheumatoid arthritis relationship to toxicity from D-Penicillamine. *J Rheumatol*, 1986; 13:269.
66. Svejgaard A., Jersild L., Nielsen S., et al. HLA antigens and disease. Statical and genetical considerations. *Tissue Antigens*, 1974; 4:95.
67. Sullivan K.E., Calman A.F., Nakanishi M. et al., A model for the regulation of the MHC class II genes. *Immunol Today*, 1987; 8: 289.
68. Terasaki P.I. Histocompatibility testing. UCLA. L.A. Calif USA. 1980; pp:34
69. Thomson W., Sanders P. A., Davis M., Dyer P.A., Grennan M. C4B null alleles in felty's syndrome. *Dis Markers*, 1988; 6:62-63.
70. Todd J.A., Acha-Orbea H., Bell J.I., et al: A molecular basis for MHC class II associated autoimmunity. *Science* 1988; 240:1003.
71. Torfs C.P., King M.C. Huey L., et al: Genetic interrelationship between insulin-dependet Diabetes mellitus, the autoimmune thyroid Diseases, and Rheumatoid arthritis. *Am J Hum Genet*, 1986; 38:170
72. Venables P. Leadin article: Epstein-Barr virus infection and autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1988; 47:265.
73. Venables P., Pawlowski T., Mumford P., et al: Reaction of antibodies to rheumatoid arthritis nuclear antigen with a synthetic peptide corresponding to part of Epstein-Barr nuclear antigen 1. *Ann Rheum Dis*, 1988; 47:270.
74. Van Rood J.J., Van Leewen A., Eernics J.G. Leucocyte antibodies in the sera of pregnant Women. *Vox Sanguinis*, 1959; 4:431

75. Wallin J., Carlsson B., Strom H., Moller E. A DR4-associated DR-DQ haplotype is significantly associated with rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism*, 1988; 31:72
76. Walker D.J., Griffiths M. and Griffiths I.D. Occurrence of autoimmune diseases and autoantibodies in multicase rheumatoid arthritis families.
77. Woodrow J.C. Immunogenetics of rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*, 1988; 15:1.
78. Woolley P.H., Griffin M.R., Panayi G.S. et al: HLA-DR antigens and toxic reaction to sodium aurothiomalate and D-penicillamine in patients with rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*, 1980; 303:300.
79. Westedt M.L. Immunogenetic heterogeneity of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 1986; 45:534.
80. Zvaifler N.J. New perspectives on the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Am J Med*, 1988;85 (4A):12.