

03062



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

**ASOCIACION DE ANTIGENOS DEL SISTEMA PRINCIPAL DE
HISTOCOMPATIBILIDAD (SPH) CON LUPUS ERITEMATOSO
GENERALIZADO (LEG) Y CON LA PRODUCCION
DE AUTOANTICUERPOS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRIA EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA
(I N M U N O L O G I A)**

P R E S E N T A :

GILDA MARIA VILLARREAL MOLINA

MEXICO, D. F.

1993

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

página

RESUMEN.....	5
INTRODUCCION	
I.LEG.....	6
II.SISTEMA PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD.....	10
III. FUNCION DEL SPH.....	12
CLASE I.....	12
CLASE II.....	14
CLASE III.....	16
IV. ASOCIACIONES DE ENFERMEDADES CON EL SISTEMA HLA.....	18
V. ASOCIACIONES DE ANTIGENOS DEL HLA CON LA PRODUCCION DE AUTOANTICUERPOS.....	20
OBJETIVO.....	23
MATERIAL Y METODOS	
I. PACIENTES.....	24
II. CONTROLES.....	24
III. TIPIFICACION DE HLA Y COMLOTIPOS	
a) TIPIFICACION DE HLA.....	25
b) TIPIFICACION DE C2.....	26
c) TIPIFICACION DE C4.....	26
d) TIPIFICACION DE FACTOR B.....	27
e) NOMENCLATURA DE GENES DEL COMPLEMENTO.....	27
IV. DETECCION DE AUTOANTICUERPOS EN EL SUERO.....	28
V.ANALISIS ESTADISTICO.....	30
RESULTADOS.....	32
DISCUSION.....	43
FIGURAS Y TABLAS.....	51
BIBLIOGRAFIA.....	64
APENDICE.....	72

**ASOCIACION DE ANTIGENOS DEL SISTEMA
PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD (SPH) CON LUPUS ERITEMATOSO
GENERALIZADO (LEG) Y CON LA PRODUCCION DE AUTOANTICUERPOS.**

RESUMEN

Se estudiaron 92 sujetos con diagnóstico de LEG, a quienes se tipificó mediante técnica de microlinfocitotoxicidad los loci HLA-A, B, C y DR. Se construyeron haplotipos del sistema principal de histocompatibilidad (SPH) estudiando por lo menos a un familiar de cada paciente y los resultados se compararon con los obtenidos en 85 controles sanos. Se estudió mediante técnica de ELISA la presencia en el suero de los sujetos estudiados los siguientes anticuerpos: anti-nucleares (ANA), anti-DNP, anti-DNA, anti-SSA, anti-SSB, anti-Sm, anti-RNP, anti-cardiolipina, anti-histonas, anti-RNA, anti-mitocondriales y los idiotipos 16/6 y SA-1. Se tomaron como positivos los niveles de anticuerpos mayores a la media de los normales más tres desviaciones estándar. Se asociaron a lupus los antígenos HLA-DR3 (razón de momios (RM) = 4.3, p corregida = 0.024) y el HLA-DRw52 (RM = 10.2, p corregida < 0.001), así como el estado heterocigoto DQw1/DQw3 (RM = 2.8, p real = 0.03). Con la presencia de anticuerpos se observaron las siguientes asociaciones: el antígeno HLA-DQw1 se asoció con anticuerpos antinucleares (RM = 3.5, p corregida = 0.027), el HLA-DRw53 se asoció con anti-Sm (RM = 9.0, p corregida = 0.032) y anti-RNA (RM = 4.5 p corregida = 0.041). Se observó una asociación negativa del HLA-DR3 con anticuerpos anti-nucleares (RM = 0.2, p corregida = 0.024). Es interesante la asociación del HLA-DR3 con el LEG, y no con la positividad de anticuerpos.

INTRODUCCION

I. LEG

El lupus eritematoso generalizado (LEG) es una enfermedad inflamatoria crónica de causa desconocida que puede afectar diferentes órganos. Sus manifestaciones clínicas incluyen: fiebre, exantema eritematoso, poliartralgias, artritis, poliserositis (especialmente pleuritis y pericarditis), anemia, trombocitopenia y alteraciones renales, neurológicas y cardíacas.

El LEG parece resultar de una alteración de la regulación inmunológica caracterizada por activación policlonal de células B, que causa un incremento en la producción de autoanticuerpos.

Se han encontrado una serie de aberraciones en la inmunorregulación de células mononucleares periféricas como: linfopenia, tanto de las subpoblaciones CD4 como CD8, función supresora anormal, disminución en la producción y respuesta a interleuquina-2, una respuesta pobre en la reacción en la mezcla de linfocitos autólogos, función defectuosa de células "asesinas" naturales y deterioro en la producción de interleuquina-1

por parte de los monocitos.

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

Los pacientes con LEG producen gran variedad de estos autoanticuerpos, los más importantes son los antinucleares (ANA), que incluyen al DNA de cadena doble (DNAd), y DNA de cadena sencilla (DNAs). También se desarrollan anticuerpos contra diversas células, como eritrocitos, plaquetas, linfocitos, o a componentes no específicos de membranas como los fosfolípidos. Es posible que estos autoanticuerpos participen en la patogénesis del LEG formando complejos inmunes que se depositan en las articulaciones, pequeños vasos, y glomérulos, donde en interacción con el complemento pueden causar inflamación y necrosis. Además pueden interactuar directamente con antígenos específicos de la membrana de eritrocitos o plaquetas, y causar así anemia hemolítica o trombocitopenia, respectivamente. La reacción también podría darse con el antígeno depositado en las membranas basales, como se ha postulado para el DNA en la piel y en los glomérulos. Finalmente, los autoanticuerpos podrían interactuar con linfocitos, causar linfopenia y así contribuir más al trastorno de inmunorregulación. También podría estar mediada por receptores Fc o por citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo.

Esta inmunorregulación anormal es producida por la interacción de factores genéticos, hormonales y ambientales. Estos tres factores muy probablemente actúan a nivel de los circuitos inmunorregulatorios de células T, que a su vez controlan la producción de anticuerpos y de autoanticuerpos.

Existen diversos datos que sugieren la participación de factores ambientales, por ejemplo se ha demostrado la presencia de autoanticuerpos tanto en familiares consanguíneos como no consanguíneos que habitan con los pacientes con LEG (68); así como también en personal del laboratorio que trabaja con los sueros de estos pacientes (4). Estos hallazgos pudieran sugerir que agentes virales pudieran contribuir en la patogénesis del LEG. Otros factores ambientales que contribuyen al desarrollo de la enfermedad están la exposición a la luz solar (radiación ultravioleta), las quemaduras y medicamentos como la procainamida, hidralazina, isoniazida, anticonvulsivos y clorpromacina ya que pueden dar lugar a una enfermedad general similar al LEG (3, 34).

La participación de factores hormonales en el desarrollo del LEG se infiere por la predominancia en mujeres. Nueve de cada diez enfermos son mujeres y la mayoría de los casos se inician entre el segundo y cuarto decenios de la vida.

Además se ha observado un incremento de la hidroxilación en C-16 de estrona, que da lugar a un incremento en los niveles de 16 α -hidroxiestrona y estrol tanto en mujeres como en hombres, una menor hidroxilación en C-2 de estrona que causa niveles bajos de 2-hidroxiestrona y 2-metoxiestrona en mujeres con LEG, y un incremento en la oxidación de C-17 de testosterona con un incremento en C-17-O-testosterona en mujeres con LEG. En conjunto todas estas anomalías pueden dar lugar a efectos estrogénicos más fuertes y de mayor duración y a efectos androgénicos más débiles. Esto a su vez puede dar lugar a una función supresora disminuida y a una función de ayuda aumentada, lo cual puede favorecer la producción de autoanticuerpos (3).

En cuanto a los factores genéticos, éstos se infieren por la alta concordancia de LEG en gemelos homocigotos y por la tendencia de ésta y otras enfermedades autoinmunes a agregarse en familias (42). También se sabe que puede haber autoanticuerpos y disminución de la función de las células supresoras en familiares consanguíneos de pacientes con LEG (37, 49, 51, 68).

Los factores genéticos se infieren además debido a que existen diferencias en la incidencia del LEG determinadas étnicamente, por ejemplo, aunque el LEG se presenta en todas las razas, en Estados Unidos la prevalencia en mujeres negras es tres veces mayor que en las mujeres blancas.

Además, se ha encontrado cierta relación entre el desarrollo de LEG y algunos marcadores genéticos del sistema principal de histocompatibilidad, particularmente el sistema antígeno humano leucocitario (HLA) (10, 26). También se han hallado asociaciones de esta enfermedad con marcadores Gm de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas (63). Otros estudios muestran que predomina el fenotipo de acetiladores lentos y otros, que están disminuidos los receptores C3b en los eritrocitos, aunque esto último puede ser tanto adquirido como genético (3).

De todos los factores genéticos, los más estudiados son las asociaciones con el sistema HLA, el cual se encuentra localizado dentro del sistema principal de histocompatibilidad (78).

II. EL SISTEMA PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD.

El sistema principal de histocompatibilidad (SPH) es un conjunto de genes que se encuentra en el brazo corto del cromosoma seis del humano (6p21.3). Abarca entre tres mil y cuatro mil pares de bases nucleotídicas e incluye a los genes del sistema HLA (los antígenos de histocompatibilidad) (22, 47, 90).

El sistema HLA (antígeno humano leucocitario) contiene una serie de loci que controlan una variedad de funciones, entre las que se encuentran la determinación de moléculas de la superficie celular, la respuesta inmune. Además tienen un papel importante en los procesos de discriminación de lo propio y no propio, en compatibilidad materno-fetal; componentes del sistema de complemento, y posiblemente otras funciones relacionadas en general con regulación de interacciones célula-célula (25).

Asimismo, se encuentran en esta región los genes del factor de necrosis tumoral α , de la glioxalasa y de la 21-hidroxilasa (60, 90).

También se localizan en la región del HLA los loci de factores del complemento C2 y C4 que controlan la vía clásica de activación y el factor B (Bf) que lo hacen en la vía alterna del complemento.

Se distinguen 3 clases de genes en la región del HLA: los de clase I, II y III.

Los antígenos de clase I están presentes en la mayoría de los tejidos del organismo, excepto en los glóbulos rojos. Los de clase II tienen una distribución más restringida, y se encuentran principalmente en linfocitos B y en monocitos o macrófagos.

El orden de los genes dentro del cromosoma desde el centrómero hasta el

telómero es: clase II (antígenos DRw, DQ y DR), clase III (complemento, 21-hidroxilasa, factor B), clase I (antígenos B, C, A) (90). (FIGURA 1 MAPA DEL SPH).

El sistema HLA es el más polimórfico de todo el genoma humano. Hasta la fecha se han definido por serología al menos 23 antígenos para el locus HLA-A, 49 para el B y se cree que al encontrarse más subtipos de cada alelo, aumenten a 50 para el HLA-A y a 100 para el HLA-B; 8 para el C, 25 para el D y 18 para el DR.

Hay algunas diferencias en frecuencias alélicas en los diferentes grupos étnicos. Por ejemplo, el antígeno A1 está en 15% de la población caucásica, 0.5% de la japonesa y 3.3% de la negra. Sin embargo, hay otros antígenos, como el A2 y el B35 que son comunes a todas las poblaciones (18, 78).

Los genes de clase I, II y III se heredan de manera mendeliana codominante.

Existe la tendencia de algunos antígenos del sistema HLA a ocurrir juntos en el mismo cromosoma con mayor frecuencia de la esperada por simple azar. A esta asociación no aleatoria se le denomina "desequilibrio de unión". Se mide por la diferencia entre la frecuencia de haplotipo observada y la esperada por azar (que es el producto de las frecuencias alélicas de los antígenos por separado) (90).

Dentro del SPH la frecuencia de recombinación génica es muy baja (menor al 2%): la fracción de recombinación entre los loci D (clase II) y B es de 0.010, entre el B y el C es de 0.001, y entre los loci C y A es de 0.007 (90). Esto se debe a que este conjunto de genes ocupa solamente unas 3800 kb del brazo corto del cromosoma 6. El entrecruzamiento entre cromosomas homólogos que de modo natural ocurre durante la meiosis, que incluya a los genes del HLA-A y -B ó HLA-B y -DR ocurre con una frecuencia un poco menor al 1% del total de ellas. Por esta razón, este complejo génico puede

considerarse como una sola unidad genética, y de hecho se hereda como tal. A dicha unidad se le conoce como **haplotipo**, ya que se transmite a través de las células haploides. Así, los alelos de los loci del SPH de un cromosoma en particular constituyen un haplotipo (el genotipo de un individuo está dado por 2 haplotipos, uno de origen materno y otro de origen paterno). Una combinación dada de alelos de los loci FB, C2, C4A y C4B forman el haplotipo de los genes del complemento, llamado también, **complotipo**.

III. FUNCION DEL SPH.

CLASE I

La región de clase I del SPH se encuentra hacia el telómero. Tiene al menos 17 genes relacionados entre sí e incluye a los loci HLA-A, -B y -C (43, 78).

Los genes de clase I mejor caracterizados son 6: HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-F(5.4)/HLA-G(6.0) Y HLA-9.2p. Abarca en total 11 centimorgans. Son muy polimórficos, y su polimorfismo es mayor que el de las regiones variables de las inmunoglobulinas. La mayoría de las posiciones polimórficas se encuentran en los residuos 1 al 194.

La función principal de las moléculas de clase I es la presentación de antígeno durante las infecciones. Los antígenos de clase I se asocian con pequeños fragmentos derivados de productos virales y presentan estos complejos a las células T- citotóxicas

de modo que sean reconocibles a los receptores de células T.

Están presentes en la mayoría de las células. Su nivel de expresión es mayor en tejidos linfoides en el adulto, en particular en las células B, y es apenas detectable en cerebro, espermatozoides y en etapas tempranas de la embriogénesis.

Los antígenos de clase I son mediadores de la eliminación alodérmica y de la restricción de los linfocitos T. Están constituidos por un par de cadenas polipeptídicas unidas de manera no covalente: una cadena pesada α , glicoproteica, transmembranal de 45 kilodaltones (kd) y de una cadena ligera β glicoproteica de 12 kd. La cadena α es polimórfica y es codificada por el HLA-A, -B o -C, la cadena β que es monomórfica se llama β 2-microglobulina la cual está codificada por un gene fuera del SPH, ubicado en el cromosoma 15.

La estructura de los antígenos de clase I se dedujo a partir de la determinación de la secuencia de aminoácidos de material purificado de una línea celular humana linfoblastoide. Estas moléculas tienen dominios extracelulares, una región transmembranal y otra citoplásmica corta. Mediante cristalografía de rayos X se ha podido determinar la estructura tridimensional de la molécula HLA-A2. La cadena pesada α consta de 3 dominios externos (α 1, α 2 y α 3). Los dominios más distales a la membrana celular son los α 1 y α 2, están dobladas en una estructura plana β -plegada y están unidas por 2 α -hélices, y son los que contienen los residuos polimórficos. Estos 2 dominios conforman el sitio de unión al antígeno, y es de esta forma que es presentado por la molécula del HLA al receptor del linfocito T. El dominio α 3 y la β 2- microglobulina están relacionadas estructuralmente a los dominios de las inmunoglobulinas y posiblemente interactúan entre sí. (72).

CLASE II (25).

La región de clase II es la más centromérica de HLA, y se subdivide en tres subregiones (DP, DQ y DR). Cada una de éstas tiene al menos un par de genes α y β (17, 22, 79).

Las moléculas de clase II se expresan sólo en ciertas células como los macrófagos, linfocitos B, células endoteliales, células dendríticas y células de Langerhans. No se expresan en linfocitos T no activados, pero su expresión puede inducirse con mitógenos o estímulos antigénicos. No las expresan los eritrocitos ni los granulocitos.

Los antígenos de clase II son los determinantes primarios en la generación de respuestas proliferativas de los linfocitos T en cultivo mixto de linfocitos y presentan el antígeno al receptor del linfocito T. Están constituidos por 2 cadenas glicoproteicas, unidas no covalentemente: una pesada α monomórfica de 33 kd y una ligera β polimórfica, de 28 kd, ambas codificadas por loci del HLA. La molécula de clase II tiene cuatro dominios externos: $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$ y $\beta 2$, análogos a los dominios $\alpha 1$, $\alpha 3$, $\alpha 2$ y $\beta 2$ -microglobulina, de la molécula de clase I, respectivamente. Los dominios $\alpha 2$ y $\beta 2$ son del tipo de los dominios constantes de las inmunoglobulinas, muy conservados y los dominios $\alpha 1$ y $\beta 1$ son polimórficos. Se ha propuesto un modelo para explicar su estructura tridimensional que es parecido al de la estructura de la molécula de clase I.

La molécula de clase II tiene asociada a las cadenas α y β una glicoproteína transmembranal de 31 kd, que se conoce como cadena γ o cadena invariante. Esta cadena no se detecta con anticuerpos en la superficie celular, y por esto se piensa que

se disocia del complejo entre el paso por el aparato de Golgi y el arribo a la membrana celular.

De las tres subregiones de los genes de las moléculas de clase II (FIGURA 1), la subregión DP consta de 2 pares de loci α y 2β , de los cuales DP α 2 y DP β 2 parecen ser pseudogenes. La subregión DR tiene 4 genes β : el β 1 codifica para las variantes de DR del DR1 al DR18, el β 2 es un pseudogene, el β 3 codifica para el determinante DRw52 y el β 4 para el determinante DRw53. Hay un gen DR α no polimórfico. Se expresan 3 tipos de productos de clase II: DP, DQ y DR. Pueden formarse pares de cadenas DQ $\omega\alpha$ y DQ $\omega\beta$ en "trans", es decir, la cadena α 1 y β 1 codificadas cada una por uno de los 2 cromosomas homólogos de un individuo. También se pueden combinar productos de los diferentes loci, como DR α y DQ $\omega\beta$ en ratones transfectados.

El polimorfismo de las moléculas de clase II está en las cadenas β de los antígenos HLA-DP, -DQ y -DR. Los residuos polimórficos se encuentran en 4 cúmulos en los dominios β 1 de DQ y DR, así como en un cúmulo en α 1 de DQ. El polimorfismo de la cadena DP β es limitado.

El polimorfismo alélico de los antígenos de clase I y II se reconoce fenotípicamente por serología.

Las variantes de HLA-Dw se detectan por cultivo mixto de linfocitos. El polimorfismo genotípico se reconoce mediante secuenciación de nucleótidos y análisis de fragmentos de restricción.

CLASE III.

Entre las regiones de clase I y II está la región de clase III. Sus genes codifican para los componentes del complemento C2, el factor B (FB), C4A y C4B, así como también para los genes estructurales de la 21-hidroxilasa A y B (21-OHA y 21-OHB).

Los genes de clase III del SPH, después del HLA-B, forman el conjunto de marcadores genéticos más polimórfico del genoma humano. Los 4 loci de esta región (C2, factor B, C4A y C4B) se heredan en bloque (6, 19).

Las moléculas de C2 y del factor B son glicoproteínas de una sola cadena, con pesos moleculares de 102,000 y 90,000 daltones, respectivamente y circulan en el plasma en forma de pro-enzimas. Se sintetizan en el hígado y en células de la línea monocito/macrófago. Ambas moléculas parecen tener tres dominios globulares.

La molécula de C4 pesa 200 kd y tiene tres subunidades unidas por puentes disulfuro: α (95 kd), β (75 kd) y γ (30 kd). Se sintetiza como una sola cadena en el orden β - α - γ , que luego es glicosilada y se procesa intracelularmente; se secreta como una estructura de tres cadenas.

La región de clase III ocupa aproximadamente 120 kb. El orden de los genes, de centrómero a telómero, es 21-OHB, C4B, 21-OHA, C4A, FB y C2.

El gene del FB tiene 18 exones, caso semejante al del gene de C2. La organización de sus exones tiene semejanza estructural y evolutiva con otras proteasas de serina. Existen 2 variantes principales de FB, detectadas por medio de electroforesis de plasma, en gel de agarosa, más inmunofijación: F y S. Hay, además 2 variantes raras, F1 y S1.

Las variantes de C2 se pueden detectar mediante isoelectroenfoque de plasma o

suero y un ensayo hemolítico. Los patrones de C2 constan de 2 bandas prominentes de lisis y de 2 ó 3 bandas adicionales ácidas o básicas. La variante común de C2 se llama C, la básica rara es B y la ácida, A.

Hay 2 loci para C4 en el humano. Producen proteínas similares que difieren serológica, estructural y funcionalmente entre sí. El polimorfismo estructural de C4 es mayor que el de C2 o FB y es el que proporciona el polimorfismo de los genotipos (14, 15). Los alelos de cada locus de C4 se designan con números según la movilidad electroforética del cátodo al ánodo. El nombre de un alelo está dado por: nombre del locus, un asterisco y un número o el símbolo "Q0" si el alelo es nulo (19, 50).

Existen alelos nulos de C4A y C4B. Alrededor de la mitad resultan pérdidas de ADN que incluyen a C4A y 21-OHA o a C4B y 21-OHB. No se ha visto pérdida de C4A y 21-OHB. Los alelos nulos que no se deben a pérdidas de DNA probablemente resultan de varios defectos en la transcripción o la traducción (19).

Los 2 loci de la 21-hidroxilasa, 21-OHA y 21-OHB, se encuentran en dirección 3' junto a los loci de C4A y C4B, respectivamente.

Se ha sugerido que los genes de la 21-hidroxilasa se duplicaron junto con los 2 genes de C4. Sólo el locus 21-OHB es importante para la biogénesis de esteroides.

Dentro del SPH se encuentra el gen de la glioxalasa I, que es el más centromérico de todos, así como los genes del factor de necrosis tumoral α y β , y están entre el HLA-B y la región de clase III y también el gen de una proteína con estructura periódica no común llamada RD (se encuentra entre el gen del factor B y el de C4A). (44).

DESEQUILIBRIO DE UNION Y HAPLOTIPOS EXTENDIDOS (90).

La frecuencia de los diferentes antígenos y haplotipos del SPH varía de una población a otra y algunos de ellos son característicos de ciertos grupos étnicos.

Pueden existir alelos de 2 ó más loci que se encuentran juntos con una frecuencia mayor a la esperada que si su asociación ocurriera al azar. Este fenómeno se llama desequilibrio de ligamiento o de unión y se presenta en el SPH. Esta es una característica del sistema HLA en todas las poblaciones estudiadas y es el fenómeno generalmente responsable de los haplotipos más frecuentes (62).

Como el desequilibrio de unión entre los loci del HLA se extiende a otros genes de la región, se forman haplotipos llamados extendidos que incluyen entonces a los genes clase I, II y III y al gen de la glicoxalasa I. Se pueden observar tales grupos de ligamiento extendido al analizar haplotipos completos del SPH (77).

IV. ASOCIACIONES DE ENFERMEDADES CON EL SISTEMA HLA.

La búsqueda de asociaciones de antígenos del sistema HLA con enfermedades específicas se estimuló al demostrarse que la región H-2 del ratón contiene genes que controlan respuestas inmunológicas específicas así como resistencias a leucemogénesis inducida por virus. Los estudios iniciales en humanos mostraron asociaciones débiles con enfermedad de Hodgkin y algunas otras. Sin embargo, estudios subsecuentes han demostrado algunas asociaciones fuertes. El término asociación como se usa aquí quiere

decir que la población de pacientes tiene un incremento en la frecuencia de un antígeno HLA particular de modo estadísticamente significativo en comparación con la población control. La asociación se describe en forma de una tabla de contingencia de 2×2 , y contiene la frecuencia del antígeno en los pacientes y su frecuencia en los controles. El valor de razón de momios (RM) es la medida más comúnmente usada de la fuerza de asociación entre una enfermedad y un antígeno de HLA particular, estimado, en este caso como la relación de los productos cruzados de cada celda en la tabla de asociación de 2×2 (1).

Las asociaciones de HLA con enfermedad pueden explicarse de dos maneras básicamente: 1.- La susceptibilidad a la enfermedad es el resultado directo de la presencia de un antígeno de HLA en particular. 2.- La asociación de un(os) antígeno(s) en particular con una enfermedad es el resultado del desequilibrio de unión entre el(los) antígeno(s) y los alelos de un locus cercano, y que confieren susceptibilidad a la enfermedad. Quizás los mejores candidatos para ser estos "loci" de enfermedad son los genes de respuesta inmune, que están bien documentados en el ratón (20).

De hecho, se han reportado asociaciones del LEG con antígenos de clase II del sistema principal de histocompatibilidad (SPH) en caucásicos, donde se han encontrado incrementados los antígenos DR-2 y DR-3 (11, 53, 77, 85, 89). También se ha observado incremento del haplotipo del sistema HLA: A1, B8, DR3, así como los alelos nulos de C4 en esta misma población (3, 5, 11, 12, 30, 33, 36, 56). En la población negra norteamericana no se ha demostrado ninguna asociación convincente con HLA-DR ni DQw, sin embargo, en ellos es muy clara la asociación con los alelos nulos de la proteína del complemento C4 (36, 62). También se han reportado otras asociaciones de alelos de

este sistema con el LEG en otros grupos étnicos como los orientales y los indúes (21, 54). En los mestizos mexicanos, a la fecha, solamente se ha publicado un estudio descriptivo y preliminar en este sentido (5). En él se describe en familias mestizas mexicanas con al menos un miembro con diagnóstico de lupus (5) la presencia de alelos nulos de C4 (ya sea en C4A o en C4B) en cuarenta y ocho de ochenta y dos de estas familias y que los pacientes con lupus casi siempre presentaron los genotipos SC01 o SC30. Otros haplotipos que se encontraron de modo frecuente en estos pacientes, y aunque no tuvieran los alelos nulos de C4 fueron el B35, DR4, SC31 y el B14, DR1, SC21. Este trabajo hace énfasis en el origen indo-mesoamericano de estos haplotipos (5).

V. ASOCIACION DE ANTIGENOS DEL HLA CON LA PRODUCCION DE AUTOANTICUERPOS ESPECIFICOS.

En caucásicos, existen varios trabajos que analizan la relación entre el sistema HLA y la producción de autoanticuerpos en diferentes enfermedades autoinmunes (9, 13, 16, 24, 27, 28, 31, 32, 39, 41, 46, 52, 53, 55, 57, 59, 61, 71, 82, 84, 87, 88). De manera más bien constante se ha reportado la relación de riesgo entre la presencia de DR3 y anticuerpos anti-SSA y/o anti-SSB tanto en lupus eritematoso generalizado como en síndrome de Sjögren (13, 29, 57). En japoneses (52) la presencia de anticuerpos anti-Sm se ha relacionado con el antígeno HLA-B61, el anti-RNP con el HLA-DQw3, y el anti-SSA con el HLA-B7. En un trabajo realizado en pacientes australianos (84) los anticuerpos anti-ENA de afinidad más baja se relacionaron con la presencia de alelos nulos en C4AQ*.

En síndrome de Sjögren primario (SS), el grupo de Morris Reichlin ha observado una asociación del estado heterocigoto DQw1/DQw2 con la presencia de anticuerpos anti-SSA y anti-SSB (característicos de esta enfermedad), aunque no están asociados (los antígenos DQw1/DQw2) a la enfermedad (el DR3 sí) (28). Esto sugiere que existe interacción génica entre DQw1 y DQw2 (o de alelos asociados a estos loci), quizás a partir de complementación génica de moléculas de superficie asociadas, y que esto influencia la respuesta autoinmune en SS. En este trabajo con 16 pacientes con lupus no encontraron asociación con este estado heterocigoto.

En un trabajo posterior, estos mismos autores (Reichlin y colaboradores) (27), analizaron 106 pacientes con LEG, cuantificaron por ELISA anticuerpos anti-Ro (anti-SSA), anti-La (anti-SSB), y anti-Sm/RNP. Observaron que los sujetos positivos a anti-Ro solo (y no anti-La) mostraron una asociación fuerte a DR2 y DQw1, así como al estado heterocigoto DR2/DR3, y en cuanto a cantidad de Ac con DQw1/DQw2. En contraste, los pacientes con LEG y positivos tanto a anti-Ro (anti-SSA) como a anti-La (anti-SSB), presentaron una asociación a B8, DR3, DRw52, DQw2. Estos datos sugieren que podría ser importante la complementación génica en las respuestas inmunológicas y sugieren que múltiples componentes moleculares del aparato inmune normal determinan la especificidad de las respuestas autoinmunes.

Savi et al evaluaron 80 pacientes italianos con LEG y observaron una fuerte asociación de niveles altos (arriba de la media más 6 desviaciones estándar de los normales) de Ac anti-CL con el DR7, además encontraron asociaciones entre los pacientes DR2 y/o DR3 con anti-Ro, y no encontraron ninguna asociación entre ningún antígeno del HLA-DR y la presencia de anticuerpos anti-Sm/RNP, anti-DNAcd o anti-La (61).

Dados estos antecedentes, este trabajo pretende conocer la relación que pudiera existir entre los marcadores genéticos del SPH y el lupus eritematoso generalizado en pacientes mestizos mexicanos tanto en la susceptibilidad genética a dicha enfermedad como en la producción de los autoanticuerpos que le son característicos.

Como ya se mencionó varios trabajos abordan ambos problemas, sin que pueda hasta la fecha establecerse una relación de carácter universal. Más aún la heterogeneidad de los resultados parece influida por el componente étnico de los individuos en estudio.

En este trabajo, se aprovecha el conocimiento inmunogenético que de la población mexicana ha sido generado por el departamento de Inmunología y Reumatología del INNSZ, para aplicarlo al estudio del LEG, y finalmente a su probable relación con la producción de los autoanticuerpos, para lo cual se estableció el siguiente:

OBJETIVO

Debido al papel relevante del SPH en la respuesta inmune, este estudio pretende estudiar las asociaciones del SPH tanto con el LEG como con la producción de autoanticuerpos.

Concretamente, el objetivo de este trabajo es analizar las posibles asociaciones en mestizos mexicanos entre genes del SPH y la presencia del LEG así como con la producción de autoanticuerpos y dos idiotipos característicos de esta enfermedad: anticuerpos antinucleares (ANA), anti-desoxirribonucleoproteínas (DNP), anti-ácido desoxirribonucleico de cadena doble (DNAcd), anti-DNA de cadena sencilla (DNAcs), anti-antígenos extraíbles del núcleo (ENA), anti-ribonucleoproteínas pequeñas nucleares (RNP), anti-Sm, anti-SSA, anti-SSB, anti-histonas totales, anti-cardiolipina (CL), anti-ácido ribonucleico de transferencia (RNA), anti-mitocondriales, así como los idiotipos 16/6 y SA-1.

MATERIAL Y METODOS.

I. PACIENTES

Se estudiaron sucesivamente 92 sujetos mestizos mexicanos con diagnóstico de LEG según criterios del American College of Rheumatology (74). La actividad de la enfermedad se determinó mediante los criterios de Urowitz (80). Para los estudios de HLA se tipificaron a las familias de los pacientes para construir los haplotipos de éstos.

II. CONTROLES

Se incluyó el suero de 38 controles sanos, así como al menos 2 controles positivos en las placas para medir anticuerpos. Este grupo de controles no incluyó personal del laboratorio ni sujetos con antecedentes heredo-familiares de enfermedad autoinmune.

Para los estudios de HLA se incluyeron los datos de 85 sujetos sanos sin historia familiar de enfermedad autoinmune, que pertenecen al Registro Nacional de Transplantes de la Secretaría de Salud. La frecuencia de los alelos del HLA en este grupo control no presentó diferencia alguna, que fuese estadísticamente significativa respecto a otros grupos de transplantes del INNSZ (familiares de pacientes que acudieron al Instituto

Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán" para trasplante de órgano, con enfermedad no ligada al HLA ni a enfermedad autoinmune) (92). Además se tomó como requisito para su inclusión dentro de este grupo control, que tuvieran al menos 3 generaciones (padres, abuelos y ellos mismos) hayan nacido en la República Mexicana. (Para las comparaciones, ver referencias 48 y 86).

III. TIPIFICACION DE HLA Y COMLOTIPOS

a) TIPIFICACION DE HLA

Los antígenos de histocompatibilidad (HLA) se tipificaron mediante la técnica de microlinfocitotoxicidad (75, 76) en linfocitos de sangre periférica. Los linfocitos se aislaron mediante gradientes de densidad con Ficoll-Hypaque. Estas células se probaron contra un equipo comercial de antisueros HLA (Pel Freeze Clinical Systems, Brown Deer, Wisconsin, USA), que definen 16 especificidades del locus HLA-A, 37 del locus B y 12 del locus DR. Para la tipificación del HLA-DR se utilizó la técnica del VIII Taller Internacional de Histocompatibilidad en Oxford, Inglaterra (81): se aislaron los linfocitos B por medio de roseteo con eritrocitos de carnero (las células B se unen a los eritrocitos de carnero y posteriormente se separan de ellos incubándolos a 4°C). Posteriormente se incuban los linfocitos B con los antisueros. De este modo, los anticuerpos presentes en los antisueros se unen a los sitios antigénicos correspondientes sobre la membrana del linfocito B y después se añade suero de conejo como fuente de complemento, y así se lisa la membrana celular. Posteriormente se tiñen con eosina las

células lisadas y se fijan con formalina. Las células así teñidas indican reacción positiva antígeno-anticuerpo.

b) TIPIFICACION DE C2.

El polimorfismo de C2 se tipificó por medio de isoelectroenfoque de plasma o suero en geles de poliacrilamida (6). Se revelaron los patrones por medio de un ensayo hemolítico con eritrocitos de carnero sensibilizados y suero humano diluido 1:90 en solución salina isotónica de veronal (lo cual lo hace deficiente en C2), con 0.1% de gelatina con $Mg^{++} 10^{-3}M$ y $Ca^{++} 1.5 \times 10^{-4}M$. El patrón de bandas de lisis es característico para cada alelo. El gen estructural de C2 tiene 3 alelos designados como C2*A, C2*B y C2*C.

c) TIPIFICACION DE C4.

El ácido siálico de muestras de plasma se eliminó mediante incubación con neuraminidasa tipo VI obtenida de Clostridium perfringens (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) a una concentración de 10 U de enzima por mililitro de plasma, durante 18 horas a 4°C. Esto se realizó simultáneamente a la diálisis de la muestra contra un amortiguador de fosfatos que contenía 0.005 mol/l de Na_2EDTA (14). Las variantes estructurales se detectaron por electroforesis del plasma desializado en geles de agarosa e inmunofijación con antisuero anti-C4 humano. Se hizo inmunoelectroforesis cruzada de muestras de plasma desializado para detectar haplotipos con alelos nulos en heterocigosis (15).

d) TIPIFICACION DE FACTOR B.

Se tipificó el factor B con muestras de plasma EDTA que se sometieron a una electroforesis en geles de agarosa con amortiguador de barbital 0.05 mol/ml, que contenía lactato de calcio (1.8 mol/ml). Los patrones se identificaron mediante inmunofijación con anti-factor B humano de cabra (Atlantic Antibodies, Scarborough, Maine), según Alper et al, 1972 (7).

e) NOMENCLATURA DE GENES DEL COMPLEMENTO.

La nomenclatura empleada está de acuerdo con las normas sugeridas por el Comité Internacional para genes humanos (70). Se asignaron los alelos de C4 según las normas acordadas en el IV Taller Internacional para la Genética del Complemento, en Boston, Mass, en 1982 (50).

En el locus C4A existen seis variantes estructurales comunes, designadas como C4A*1 hasta C4A*6, y una variante nula, designada como C4A*Q0. En el locus C4B hay cinco variantes estructurales comunes, designadas como C4B*1 hasta C4B*5 así como una variante nula, C4B*Q0.

Los alelos de estos genes se heredan en bloque (y son llamados complotipos). Por ejemplo, el complotipo SC31 está constituido por los alelos FB*S, C2*C, C4A*3, C4B*1.

IV. DETECCION DE AUTOANTICUERPOS EN EL SUERO.

Mediante equipos comerciales de ELISA (BioHyTech, Israel) se midieron los niveles de anticuerpos en el suero de los 92 individuos estudiados. Se midió la presencia de anticuerpos contra ácido desoxirribonucleico (DNA) de cadena doble (DNAcd) así como también de cadena sencilla (DNAcS) de timo de ternera (Sigma) como lo describen Shoenfeld et al (66). Se cubrieron secuencialmente placas de 96 pozos de fondo plano (Dynatech) con 50 $\mu\text{g/ml}$ de poli-L-Lisina (Sigma), el antígeno en cuestión (2 $\mu\text{g/pozo}$). Después de lavarse las placas, se cubrieron con 50 $\mu\text{g/ml}$ de poli-L-glutamato. Después de 2 horas de bloqueo con 2% de suero bovino en amortiguador salino con Tris (TBS), se lavaron las placas. Los sueros diluidos 1 a 200 (es decir, doscientas veces) se colocaron en los pozos y se incubaron por 2 horas. Después de 3 lavados con PBS-albúmina sérica bovina, se añadieron inmunoglobulinas de cabra antihumanas, conjugadas con fosfatasa alcalina (Sigma). Se midió la absorbancia a 405 nm con un espectrofotómetro (Titertek).

Se detectaron anticuerpos anti-histonas como describen Shoenfeld et al (67). Se cubrieron placas de ELISA con 2.5 $\mu\text{g/ml}$ de histonas totales en NaHCO_3 , pH 9.6, durante toda la noche a 4°C. Se lavaron las placas con amortiguador BBS (1 M NaCl, 0.025 M borato de sodio, 0.1 M ácido bórico, pH 8.3). El resto del procedimiento se llevó a cabo como se describe arriba.

Los anticuerpos anticardiolipina se detectaron como describen Shoenfeld et al (66, 69). Se cubrieron placas de poliestireno con 5 $\mu\text{g/ml}$ de cardiolipina (Sigma) en etanol hasta evaporarse, durante toda la noche. Se bloquearon las placas con 2% de suero

bovino fetal en TBS, y se aplicaron los sueros diluidos y la reacción enzimática se llevó a cabo como se describe arriba.

Los anticuerpos antinucleares anti-Sm, anti-RNP, anti-SSA y anti-SSB se detectaron de acuerdo a M Firer et al (23). Se emplearon autoantígenos extraídos de células frescas de timo. Se cubrieron las placas con 5 $\mu\text{g/ml}$ del antígeno y el procedimiento se llevó a cabo como se describió arriba.

Los otros anticuerpos que se estudiaron fueron ANA (anticuerpos anti-antígenos nucleares totales), deoxirribonucleoproteínas (DNP), ENA (anticuerpos contra antígenos extraíbles del núcleo), ácido ribonucleico de transferencia (RNA) y mitocondria (23, 91).

Para detectar la presencia de los idiotipos SA-1 y 16/6 (38) en dichos sueros, se cubrieron placas de 96 pozos con el anticuerpo anti-idiotipo de conejo, anti-SA-1 diluido 1:4000 y 16/6 en una dilución 1:2000 en amortiguador de bicarbonatos de sodio 0.05 M, pH 9.6 (para una concentración final de 10 $\mu\text{g/ml}$ del anti-idiotipo) y se incubaron durante 12 a 14 horas a 4°C. Se lavaron 3 veces con amortiguador salino de fosfatos (PBS) y se bloquearon 2 horas con PBS-1% de albúmina sérica bovina libre de gamma globulinas). Se lavaron 3 veces con PBS y se aplicaron los sueros diluidos 1:2000 en PBS. Se incubaron durante 1 hora a 37°C. Se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron con anticuerpos de cabra anti-inmunoglobulinas humanas de tipo G, M y A conjugadas a fosfatasa alcalina. Se incubaron por 2 horas a 37°C y se lavaron con PBS. Se aplicó después el sustrato diluido en amortiguador de boratos 0.05 M, pH 9.6 y se leyó la absorbancia a 405 nm.

V. ANALISIS ESTADISTICO.

Los datos de cada uno de los pacientes se capturaron en una computadora a través del programa DBASE.

Los marcadores genéticos del SPH que se consideraron para el análisis estadístico fueron aquéllos cuyas prevalencias génicas en la población con lupus fuesen superiores a 0.02.

Se consideraron como puntos de corte de los anticuerpos, el promedio de los controles sanos más 3 y más 5 desviaciones estándar. Con estos puntos de corte se excluyó al 95% de la población normal (media de los controles más 3 desviaciones estándar) y cuando menos al 97.5% (con el punto de corte de 5 desviaciones estándar) (ver el apéndice para los datos de los controles).

En el análisis estadístico de los datos se estimó la fuerza de las asociaciones a través del cálculo de la razón de momios (RM) (razón de productos cruzados) de la relación de cada alelo de clase I, II o III del SPH de los sujetos sanos versus los enfermos; así como de la relación, en los enfermos, entre la presencia de los antígenos de histocompatibilidad y de cada uno de los trece anticuerpos y de los dos idiotipos estudiados. Su significancia estadística se calculó mediante la prueba de chi-cuadrada con la prueba de Mantel Haenszel o la prueba exacta de Fisher (cuando el valor esperado de una de las celdas de la tabla de 2 X 2 es menor de 5) (1). Esto se hizo en computadora a través del paquete estadístico EPIINFO.

El valor de alfa se fijó en 0.05. Para poder definir de modo preciso las asociaciones de los antígenos del SPH, tanto con la presencia de enfermedad como con la presencia

de anticuerpos se realizó un ajuste al valor de alfa mediante corrección de Bonferroni (40). Para esto se multiplicó el valor de p por el número de comparaciones realizadas. De esta manera se calculó la p corregida (también conocida como "p real").

Se consideraron significativas solamente a las asociaciones con valores de p de 0.05 ó menores y cuyos intervalos de confianza al 95% no incluyeran a 1.

En las asociaciones de riesgo, se estimó la fracción etiológica (FE), definida como el número de casos atribuibles a la exposición (en este caso, a la presencia de un alelo particular del SPH). Esto se hizo mediante la fórmula siguiente:

$$FE = (a/m1)(RM-1/RM),$$

donde "a" es el número de casos (en este trabajo son los enfermos o bien los sujetos positivos a los anticuerpos que se estén probando) expuestos al factor que se está comparando (en este caso, el antígeno de HLA); m1 es el número total de casos; y RM es el valor de la razón de momios (1).

Se realizó adicionalmente análisis de regresión logística a través el programa estadístico para computadora EGRET. Así las relaciones de antígenos de histocompatibilidad con los diferentes autoanticuerpos e idiotipos estudiados que tuvieron significancia estadística por chi-cuadrada, se controlaron por las posibles variables de confusión (es decir, variables que no son el HLA y que pudieran afectar la producción de autoanticuerpos), que en este estudio se consideraron, y que fueron: el estado de actividad del paciente en el momento de la toma de muestra, la edad, el sexo, y si estaban recibiendo tratamiento con inmunosupresores y/o prednisona.

RESULTADOS

De los noventa y dos pacientes con diagnóstico de LEG que se incluyeron en este estudio, 3 pacientes pertenecen a una misma familia, y tres pares de sujetos con lupus pertenecen a tres familias respectivamente; además no se contó con el estudio de familias en 21 pacientes para poder determinar los haplotipos en ellos, por lo cual se consideraron a los 71 sujetos a quienes sí se estudió a su familia para los estudios de asociación con haplotipos.

Ochenta y dos de los pacientes son del sexo femenino y los diez restantes del masculino.

La edad promedio (\pm desviación estándar) fue de 35.8 (\pm 11.4) años, el tiempo de evolución del lupus de 11.0 (\pm 14.5) años.

Dieciocho pacientes se encontraban en estado de remisión mayor de un año, dieciocho más, en estado de actividad, y los restantes en estado de inactividad o remisión menor de un año.

De los dieciocho pacientes con LEG activo, seis tenían actividad articular, siete manifestaciones mucocutáneas, tres hematológicas, seis actividad renal y cinco otras manifestaciones de actividad (que no incluyen actividad en el sistema nervioso central ni actividad serosa).

Cuarenta y cuatro pacientes no estaban recibiendo tratamiento, 47 estaban bajo

tratamiento con prednisona y 15 con algún inmunosupresor: del conjunto de pacientes que estaban bajo tratamiento, 23 recibían menos de 15 mg de prednisona por día, y 25 más de 15 mg de éste y/o algún inmunosupresor. De los pacientes con actividad, una tercera parte estaba sin tratamiento, otra tercera parte estaba recibiendo 15 mg o menos de prednisona y el último tercio recibía más de 15 mg de prednisona y/o inmunosupresores al día.

Las tablas I (de la tabla Ia a la Ih) muestran las frecuencias fenotípicas de los antígenos del HLA en los 92 pacientes. Se observa que el antígeno más frecuente del locus del HLA-A es el HLA-A2 (50.0%), seguido en orden descendente por el HLA-A9 (25.0%), A1 (21%), A19 (17.4%), A3 (15.2%), A10 (14.1%), A28 (12.0%), A11 (9.8%).

Si se comparan mediante tablas de contingencia de 2 x 2 las frecuencias de cada uno de estos alelos respecto a la población normal mestiza mexicana como lo muestra la tabla II, solamente existe diferencia estadísticamente significativa en el antígeno HLA-A3, el cual se presenta con mayor frecuencia en la población lúpica (con una razón de momios de 2.8, $p = 0.043$) que en los controles. Sin embargo, al aplicar la corrección de Bonferroni se pierde la significancia estadística de esta asociación (p corregida = 0.344).

Del locus del HLA-B los antígenos más frecuentes son el B35 y el B12 (cada uno con 19.6%), les siguen el HLA-B5 (18.5%), el B7 (con una frecuencia de 15.2%), B14 (13.0%), B8 (12%), B15 y B21 (con 10.9% cada uno), B17, B16 y B40 (todos con una frecuencia de 8.7%), el de menor frecuencia de todos fue el B22 con 7.6%.

Las tablas de contingencia de los antígenos del locus B que compararon 85 sujetos normales contra los 92 sujetos con diagnóstico de LEG muestran que el HLA-B7, y HLA-B8 tienen riesgos de 2.8 y 3.2 veces, respectivamente, más probabilidad de presentar lupus si el individuo tiene estos antígenos de histocompatibilidad que si no los tiene. En contraste, el antígeno HLA-B16 se presenta con una frecuencia significativamente menor en los pacientes respecto a los controles (razón de momios de 0.3, $p = 0.004$). Sin embargo todas las asociaciones del locus B con esta enfermedad autoinmune perdieron su significancia estadística cuando se aplicó la corrección de Bonferroni (p corregidas > 0.05).

La tabla I también muestra las frecuencias de los antígenos HLA-DR en esta población. Al compararlo con los controles sanos (tabla II) se observa que el HLA-DR3 se encuentra en mayor proporción en los sujetos enfermos que en los controles (el riesgo fue de 4.3, con una significancia de 0.0003, y una p corregida de 0.024).

El antígeno HLA-DQw3 se presentó con una frecuencia de 55.4%, seguido por el DQw1 (51.1%), y finalmente del DQw2 (30.4%). La tabla II muestra que el antígeno DQw1 presenta una relación de riesgo para LEG (RM = 2.1, $p = 0.029$).

El antígeno DRw52 está presente en 63 % de los enfermos mientras que el DRw53 en 55.4%. De hecho, como se muestra en la tabla II, el antígeno DRw52 tiene una relación de riesgo para esta enfermedad autoinmune (RM = 10.2. I.C.95% = 3.2-32.5, p corregida = 0.000001, fracción etiológica = 0.83).

El genotipo más frecuente en LEG es el SC31, y tiene una frecuencia semejante a la de la población normal (ver Tabla Ic). Los pacientes con LEG lo presentan con una frecuencia génica del 39.4% y los controles con una de 48.2%. Lo siguen el SC01

(15.5%), el SC42 (7.0%), FC31 y SC30 (ambos presentes en 6.3% de la población). El complotipo FC30 está presente en 5 sujetos, y el SC21 y SC32 en 3 (2.1% de los sujetos enfermos). Las tablas de contingencia no mostraron ninguna diferencia significativa entre los sujetos con LEG y los controles respecto a la presencia de complotipos, excepto para el complotipo SC01, que es más frecuente en los enfermos, con una razón de momios de 2.2, y un valor de p de 0.037.

Si se toma como punto de corte la media más 3 desviaciones estándar de la población control, se observa que en esta población, 56.5% de los pacientes presentaron anticuerpos anti-nucleares (ANA), 35.9% anti-DNP, 33.7% anti-DNAcd, 45.7% anti-ADNcs, 41.3% anti-antígenos extraíbles del núcleo, 22.8% anti-RNP, 26.1% anti-Sm, 19.8% anti-SSA, 10.9% anti-SSB, 19.6% anti-CL, 37.0% anti-ARNt, 7.6% anti-mitocondriales, 45.3% anti-histonas totales y respecto a los idiotipos estudiados el 16/6 estuvo presente en el 9.8% de la población y el SA-1 en el 12.0% (tabla III). Todas estas frecuencias fueron comparables a las obtenidas en un estudio anterior al presente trabajo realizado en este mismo laboratorio con 465 pacientes mexicanos con lupus eritematoso generalizado (83).

La distribución de los diversos auto-anticuerpos e idiotipos se muestra en la tabla IV y se relaciona a los diversos antígenos del HLA. Esto permitió el análisis detallado de las asociaciones potenciales entre la presencia de antígenos codificados por el SPH y la presencia de anticuerpos específicos (en esta tabla, el punto de corte para definir presencia de autoanticuerpos es la media de los controles más 3 desviaciones estándar). Sólo se muestran las asociaciones que tuvieron diferencias estadísticamente significativas

($p < 0.05$). Se observaron tanto asociaciones positivas (de riesgo) como negativas (de "protección").

De los antígenos de clase I, sólo el locus B presentó asociaciones, de éstos, cabe destacar que el B7 se presentó como factor de riesgo en la producción de anticuerpos anti-RNP y anti-Sm con riesgos de 4.2 (I.C. 95% 1.1-16.8, $p=0.035$, p real no significativa) y 3.9 (I.C. 95% 1.1- 15.1, $p= 0.039$, p corregida = 0.663), respectivamente. También se asoció de manera positiva el B12 con anticuerpos antinucleares e histonas totales (RM = 4.7, $p = 0.017$, p real no significativa; RM = 5.0, $p = 0.008$, p real = 0.136); respectivamente). La presencia del HLA-B5 confirió un riesgo de 9.4 veces más probabilidad de tener anticuerpos anti-mitocondriales, con un intervalo de confianza del 95% de 1.3 a 84.3, y una $p = 0.005$ (p corregida no significativa).

De los antígenos de clase II, el HLA-DR6 se asoció de manera positiva con la presencia de anticuerpos anti-Sm (RM = 4.4, $p= 0.030$, p real = 0.240) y anti-SSA (RM = 4.0, $p = 0.049$, p corregida = 0.392).

El HLA-DR3 presentó una asociación negativa con anticuerpos anti-nucleares (RM = 0.2, I.C.95% = 0.1-0.7, $p = 0.003$, p corregida = 0.024), anti-DNA de cadena sencilla (RM = 0.3, I.C.95% = 0.1-0.9, $p = 0.017$, p real no significativa) y con anti-RNP (RM = 0.25, I.C.95% = 0.04-1.0, $p = 0.035$, p corregida no significativa).

El antígeno DRw53 se encontró asociado a los siguientes anticuerpos: anti-RNP (RM = 8.3, $p = 0.031$, p corregida = 0.06), anti-Sm (con un riesgo de 9.0, p corregida = 0.032), anti-RNA (RM = 4.5, $p = 0.021$, p corregida = 0.041).

Los pacientes positivos para el antígeno HLA-DQw1 presentaron un riesgo 3.5 veces mayor de tener anticuerpos antinucleares que aquéllos que fueron negativos ($p =$

0.009, p real o p corregida = 0.027).

La presencia de la glioxalasa 1 (GLO1) se relacionó de modo positivo (relación de riesgo) con los anticuerpos anti-antígenos extraíbles del núcleo (ENA) con una razón de momios de 3.8, y una p real de 0.020, y con la presencia del idiotipo 16/6 (RM = 20.3, p corregida = 0.001).

Las relaciones entre antígenos de HLA y anticuerpos que se muestran en esta tabla IV (representados como valores de riesgo, R.M., así como de significancia estadística, p) no sufrieron modificaciones importantes al ser analizados mediante regresión logística y al ser controlados por las variables de confusión (actividad, tratamiento, edad y sexo) (datos no mostrados).

No se observó ninguna asociación significativa de los complotipos SC31, SC01, SC42, FC31, SC30, FC30, SC21 y SC32 con ninguno de los anticuerpos estudiados.

Se probaron asimismo las posibles asociaciones de los haplotipos y haplotipos extendidos más frecuentes en esta población. No se encontraron asociaciones significativas con ninguno de los anticuerpos estudiados.

También se estudió la posibilidad de que la heterocigosia de los genes de clase II pudiese influir también en la producción de autoanticuerpos (Tabla VII). Se observó que los cuatro individuos DR4/DR5 fueron negativos para anticuerpos anti-nucleares, y de los setenta y tres negativos para dichos antígenos del HLA, cuarenta y seis tampoco

presentaron dichos anticuerpos. Esta relación resultó en una razón de momios de 0.07, con una p de 0.046 (p real no significativa).

Los individuos heterocigotos para DQw1/DQw2 no mostraron ninguna asociación que fuera significativa para ninguno de los anticuerpos estudiados.

Los heterocigotos DQw1/DQw3 presentaron una asociación positiva con los anticuerpos antinucleares (RM = 2.9, p = 0.035, p real = 0.2).

También se evaluaron las posibles interacciones "cis" (es decir, en el cromosoma homólogo) del HLA-DR y HLA-DQ que pudiesen asociarse significativamente para conferir algún riesgo para producir anticuerpos. Se observó que la presencia de DR3/DQw2 potenció el efecto protector del DR3 tomado de manera independiente a los DQw, para presentar anticuerpos anti-DNAcs: con una razón de momios de 0.1, intervalos de confianza al 95% de 0.01 a 0.7, y un valor de p de 0.006 (p real = 0.108).

Por otra parte, se observó que todos los individuos DQw1 que también fueron DR6 (n = 7) presentaron anticuerpos antinucleares (RM = infinito, p = 0.019, p real no significativa).

La presencia de uno o dos alelos nulos del complemento tuvo una relación de protección para la presencia de DNP. (RM = 0.34, IC 95% 0.12-0.98, p = 0.027).

Tampoco se encontró asociación alguna con los haplotipos extendidos de HLA-A,B,DR,complotipo; HLA-B,DR,complotipo; HLA-B,complotipo y HLA-DR,complotipo.

Dado que algunos autoanticuerpos tienden a agruparse (por ejemplo, los anticuerpos antinucleares, anti-DNP, anti-DNA de doble cadena y de cadena sencilla), los anti-Sm y los RNP, los anti-Ro y anti-La, se establecieron cuatro grupos nuevos de

pacientes: el grupo I incluye a los pacientes positivos para ANA, y/o anti-DNP, y/o anti-DNAcd, y/o anti-DNAcs; el grupo II incluye a los positivos para anti-SSA y/o anti-SSB; el grupo III a los individuos que presentaron anticuerpos anti-Sm y/o RNP; y el grupo IV a los individuos positivos a anti-SSA, y/o SSB, y/o Sm y/o RNP.

Los resultados de estas comparaciones se muestran en la tabla V. Se presentaron como factores de riesgo el antígeno de clase I HLA-B7 para la presencia de anticuerpos anti-Sm y/o anti-RNP ($RM = 3.9$, $p = 0.024$, p real no significativa). También el antígeno de clase II HLA-DRw53 para la presencia de anticuerpos anti-Sm y/o RNP ($RM = 10.7$, p corregida = 0.020), así como para la presencia de estos dos últimos anticuerpos además de anti-SSA y/o SSB ($RM = 9.6$, p corregida = 0.036).

En esta misma tabla V se muestran las asociaciones negativas entre los antígenos del HLA y los conjuntos de anticuerpos que se definieron. De los antígenos de clase I, el B35 se asoció a la ausencia de anticuerpos anti-Sm, y/o anti-RNP ($RM = 0.15$, $p = 0.009$, p real = 0.153), así como a la ausencia de estos dos últimos anticuerpos además de anti-Ro y/o anti-La ($RM = 0.2$, $p = 0.024$, p corregida = 0.408).

De los antígenos de clase II se asociaron negativamente el HLA-DR3 y el HLA-DQw2. Ambos antígenos presentaron riesgos de 0.3 para presentar anticuerpos anti-SSA (anti-Ro) y/o anti-SSB (anti-La), y un valor de p de 0.052 (p reales > 0.05). Además, el DR3 se asoció también a la ausencia de anticuerpos anti-nucleares, y/o anti-DNP, y/o anti-DNA de doble cadena y/o de cadena sencilla ($RM = 0.3$, $p = 0.020$, p corregida = 0.160).

Posteriormente se evaluaron las posibles relaciones entre los antígenos del sistema principal de histocompatibilidad y los mismos autoanticuerpos, pero a títulos altos (mayores a la media de los normales más cinco desviaciones estándar). Los resultados de estas comparaciones se muestran en la tabla VI.

De los antígenos de histocompatibilidad de clase I, el HLA-B5 se relacionó con la presencia de títulos altos de anticuerpos anti-SSB (RM = 7.4, $p = 0.049$, p corregida > 0.05), el B14 tuvo una relación positiva con la presencia de títulos altos de anticuerpos anti-SSB (RM = 11.3, $p = 0.021$, p real > 0.05), el B17 con anti-RNA (RM = 5.0, $p = 0.042$, p corregida no significativa), y el B27 con anticuerpos a antígenos extraíbles del núcleo (RM = 7.5, $p = 0.029$, p real = 0.493).

De los antígenos de clase II, se presentaron como factores de riesgo para producir títulos altos de anticuerpos: el DR1, el DQw3 y el DP53. El DR1 con un riesgo de 5.4 veces mayor probabilidad de tener títulos altos a DNACd ($p = 0.021$, p real > 0.05), el DQw3 y DP53 con anticuerpos antinucleares (RM = 3.1, $p = 0.041$, p corregida no significativa; RM = 3.9, $p = 0.038$, p real > 0.05, respectivamente).

El antígeno DR3, al igual que a títulos menores de los anticuerpos, se presentó como factor de protección para presentar títulos altos de anticuerpos anti-DNA tanto de cadena doble como de sencilla (RM = 0.1 $p = 0.049$ p real = 0.392, RM = 0.1 $p = 0.008$ p real = 0.064, respectivamente).

La presencia de alelos nulos del complemento de C4B confirió un riesgo de 7.0 veces mayor probabilidad de presentar títulos altos de autoanticuerpos a RNP ($p = 0.035$, p corregida 0.175, fracción etiológica = 0.571), y de 10.1 para anti-cardiolipina ($p = 0.050$, p real = 0.250).

Los individuos G10*1 presentaron riesgos, con significancia estadística, de 2.8 ($p = 0.043$, p real = 0.086), 4.1 (p corregida = 0.036) y 3.2 ($p = 0.035$, p real = 0.07), para tener títulos altos de anticuerpos antinucleares, anti-DNAcs y anti-antígenos extrañbles del núcleo, respectivamente. El genotipo SC30 confirió riesgos con significancia estadística de 27.0 y de 15.7 para tener títulos altos de anticuerpos anti-SSA ($p = 0.007$, p corregida = 0.042) y cardiolipina ($p = 0.048$, p corregida = 0.288), respectivamente (tabla VII).

Se probaron también las posibles interacciones entre antígenos de clase II de los individuos heterocigotos y su posible papel en la producción de títulos altos de anticuerpos. Los resultados de este análisis se muestran en la tabla VII. Se observó que los heterocigotos DQw1/DQw3 tuvieron una relación de riesgo para presentar títulos altos de ANA (RM = 3.4, $p = 0.020$, p real > 0.05), anti-DNP (RM = 3.7, $p = 0.036$, p corregida no significativa), anti-DNAcd (RM = 3.7, $p = 0.045$, p real > 0.05) y la presencia de cualquiera de los anteriores anticuerpos y/o de anti-DNAcs (RM = 3.1, $p = 0.023$, p corregida > 0.05).

Con respecto a las interacciones entre antígenos del HLA-DR, se observó que los individuos heterocigotos para DR4/DR6 presentaron riesgos significativos de presentar los siguientes anticuerpos: DNP (RM = 16.6), DNAcs (RM = 15.2), ENA (RM = 14.0) y Sm (RM = 12.0). Asimismo, los heterocigotos DR1/DR7, presentaron un riesgo de 10.7 veces más probabilidad de tener títulos altos de anticuerpos anti-SSA y/o anti-SSB ($p = 0.020$). Sin embargo de estas asociaciones, ninguna permaneció significativa después de corregir el valor de p (corrección de Bonferroni).

La presencia de uno o ambos alelos nulos de C4 se presentó con un papel protector para presentar anticuerpos anti-DNP a títulos altos (RM = 0.3, $p = 0.027$).

DISCUSION

Este trabajo describe y analiza en una población de 92 sujetos mestizos mexicanos con lupus eritematoso generalizado, el posible papel que tienen los genes del sistema principal de histocompatibilidad en la susceptibilidad a la enfermedad y en la producción de autoanticuerpos característicos de ésta.

En esta población con LEG se encontró un incremento estadísticamente significativo del antígeno de histocompatibilidad HLA-DR3. La fuerza de asociación de este antígeno ($RM = 4.4$, p corregida = 0.024) es semejante a la reportada en otros grupos étnicos.

Este estudio confirma en el paciente lúpico mexicano, los hallazgos de incrementos en DR3 y DRw52 en otros grupos étnicos (caucásicos y orientales). El riesgo más alto lo confirió el DRw52. Este alelo está codificado por la cadena B3 de la región HLA-DR. Sin embargo, este dato (es decir, la asociación del HLA-DRw52 con LEG) debe tomarse con cautela, debido a que los métodos utilizados para tipificar estos antígenos de histocompatibilidad (anti-sueros y microlinfocitotoxicidad) no detectan las diferentes variantes polimórficas de este antígeno supratípico. La detección de estas variantes es particularmente importante en el lupus. De hecho, uno de ellos (DRw52a) se ha encontrado asociado con LEG en caucásicos (45). Por lo tanto, este punto en la población

mexicana requiere el análisis molecular correspondiente.

De cualquier manera, estos datos sugieren que la cadena DR β 1 y DR β 3 influyen en la susceptibilidad genética a LEG.

Respecto al locus del HLA-DQ, el hallazgo importante fue que ninguno de los alelos tomados de modo individual fue más prevalente en la población lúpica que en los controles, pero que el estado heterocigoto DQw1/DQw3 fue más frecuente en el lúpico que en el control (RM = 2.8, p = 0.005, p corregida = 0.030).

Todos los demás antígenos incrementados en la población con LEG no tienen significancia estadística, o bien la pierden al multiplicar la p. por el número de alelos probados ("p corregida").

Se encontró una disminución significativa del antígeno HLA-B16 en LEG. En la población normal el B16 es el segundo alelo más común de B (está presente en el 27.1% de la población mestiza mexicana).

En contraste a reportes de otros grupos (56, 82), donde se ha encontrado un incremento de la frecuencia de alelos nulos de C4A y C4B, en esta población, la presencia de alelos nulos en C4A y en C4B fue comparable a la de la población normal mestiza mexicana (sus frecuencias génicas en LEG fueron de 0.13 y 0.094 respectivamente). Esto difiere de lo reportado en algunos otros grupos étnicos (56, 82), donde se ha encontrado un incremento en la frecuencia de alelos nulos de C4A y C4B.

Las asociaciones de anticuerpos con los alelos del MHC que se encontraron tomando como punto de corte la media de los normales más 3 desviaciones estándar (Tabla IV), mostraron relación de riesgo entre los anticuerpos anti-Sm y anti-SSA con el antígeno HLA-DR6. Estas relaciones positivas entre estos anticuerpos con el HLA-DR6 no

han sido descritas en ningún otro grupo étnico y aunque sus riesgos relativos no son muy elevados sí son suficientemente significativos para tomarse en cuenta. También llama la atención la asociación de ANA con el HLA-DQw1, ya que se ha propuesto que los alelos de este locus (HLA-DQ), intervienen en la producción de anticuerpos (28). Finalmente, llama la atención la asociación positiva encontrada entre la presencia del idiotipo 16/6 y el alelo 1 del locus de la glioxalasa (Glo*1); el riesgo relativo no sólo es muy elevado, sino que de los diez pacientes positivos para el idiotipo sólo uno de ellos no presenta el Glo*1, cuya frecuencia génica en la población normal es de 0.25 (para Glo*1), lo que da lugar a una p muy significativa. Estos hallazgos sugieren que existe la posibilidad de que la producción de anticuerpos, por lo menos en esta muestra de mexicanos está influida por la región HLA-DQ y la región HLA-DR, mientras que el mecanismo que da lugar a la presencia del idiotipo 16/6 estaría situado más centroméricamente (más de 5 centimorgans) de la región clase II del MHC.

En el análisis también se observaron asociaciones negativas de autoanticuerpos con alelos de los genes del MHC (Tabla IV). La interpretación de dichas asociaciones es más difícil de establecer que las que son positivas, sin embargo, cabe resaltar aquélla del HLA-DR3 con ANA, anticuerpos anti-RNP, y anti-DNAcs, sobretodo porque como ya se dijo, el HLA-DR3 es ampliamente reconocido como marcador de susceptibilidad genética para LEG, lo que sugiere que los mecanismos de producción de auto-anticuerpos y de enfermedad son independientes, y que el papel de los genes del MHC en dichos mecanismos probablemente sean diferentes entre sí. En otras palabras, el reconocimiento antigénico ejercido por la molécula clase II posiblemente es distinto para el HLA-DR que para el HLA-DQ.

Finalmente cabe resaltar la asociación del antígeno supertípico HLA-DRw53 con los autoanticuerpos anti-RNP, anti-Sm y anti-RNA de transferencia, ya que dicho antígeno reacciona cruzadamente con DR4, DR7 y DR9, alelos que parecen influir en la producción de dichos autoanticuerpos en otras poblaciones como la caucásica (41). Esto nuevamente distingue alelos asociados con lupus de aquéllos asociados con la producción de autoanticuerpos. En este sentido el DRw52 (cadena DR β 3) se asocia con LEG mientras que el DRw53 (cadena β 4) se asocia con los auto-anticuerpos anti-RNP, anti-Sm y anti-RNA.

Ya que los títulos muy altos de anticuerpos (por arriba de la media de los controles más 5 desviaciones estándar) pueden correlacionarse con el pronóstico de la enfermedad, también se buscaron posibles asociaciones de esta condición con los alelos del MHC. Los resultados de la tabla VI muestran los marcadores del SPH relacionadas a títulos altos de autoanticuerpos. Se observa que el alelo Glo^*1 confiere riesgo de presentar títulos altos de anticuerpos anti-DNAcs (RM = 4.1, I.C. 95% = 1.2-13.8, p corregida = 0.036), esto podría sugerir la existencia de genes situados centroméricamente a la región clase II del MHC que influyen en la producción de estos autoanticuerpos y cuya identificación aún está por hacerse. Ninguna de las otras asociaciones encontradas permanece significativa después de corregir el valor de p por el número de comparaciones realizadas. Sin embargo, hay tres asociaciones que requieren discusión: primero, la de C4BQ*0 y títulos altos de anticuerpos anti-cardiolipina. Esta asociación confirma la encontrada en un trabajo previo (J Granados et al, manuscrito en preparación) donde también se observó un incremento en los alelos nulos del complemento en un conjunto de 74 familias que incluían 80 pacientes con LEG (más síndrome de antifosfolípido secundario) y 384

familiares de primer grado.

Segundo, el alelo nulo de C4B también parece asociarse a títulos altos de anticuerpos anti-RNP. Esta asociación no se ha encontrado en un grupo de 30 familias mexicanas con enfermedad mixta del tejido conectivo (EMTC), enfermedad donde existen títulos elevados de anti-RNP (manuscrito en preparación). Este hallazgo, podría también apoyar la noción de la EMTC como una entidad separada del LEG.

Tercero, se observó de nuevo, una asociación negativa entre DR3 y anticuerpos anti-DNA de cadena sencilla y también de doble cadena. De hecho, 27 de 28 pacientes quienes expresan el fenotipo DR3 no mostraron títulos altos de anti-DNAcd, así como 26 de 28 sujetos HLA-DR3 tampoco presentaron títulos altos de anticuerpos anti-DNAcs.

Dado que los alelos del SPH de clase II parecen ser los más importantes en la producción de autoanticuerpos, buscamos posibles combinaciones DR/DQ que pudieran actuar conjuntamente en la susceptibilidad a la producción de autoanticuerpos.

De todas las combinaciones posibles de DR/DQ, el único haplotipo que presentó asociación significativa fue el DR3/DQw2, con anticuerpos anti-DNAcs, en donde muestran una relación negativa. Como se mencionó en párrafos anteriores, el DR3 solo, muestra también una relación negativa con este autoanticuerpo, pero en presencia del DQw2 en el mismo haplotipo, esta asociación se hace más significativa ($RM = 0.1$, $p = 0.0057$).

Por otra parte, el estado en el locus HLA-DQ también se ha asociado a la producción de autoanticuerpos tanto en lupus como en otra enfermedad autoinmune como es el síndrome de Sjögren, en donde se ha encontrado asociación del fenotipo DQw1/DQw2 con anticuerpos anti-SSA y anti-SSB, en pacientes caucásicos (24). Por esto también nos interesó estudiar este tipo de asociaciones en nuestra población de estudio.

Las asociaciones con autoanticuerpos positivos a 3 desviaciones estándar arriba de la media de los controles, no mostraron significancia estadística. Sin embargo, a títulos altos de autoanticuerpos (niveles por arriba de la media de los controles más 5 desviaciones estándar), se observó (tabla VII) que los heterocigotos DQw1/DQw3 parecen asociarse con anticuerpos antinucleares, anti-DNP y anti-DNAcd. Sin embargo, estas asociaciones no permanecieron significativas después de corregir los valores de p .

La heterocigosia muestra complementación entre los alelos del HLA-DQ para la producción de autoanticuerpos tanto en la población caucásica como en la mestiza mexicana, sin embargo, los alelos involucrados en la población mestiza mexicana son diferentes; mientras que el DQw1 parece complementarse con el DQw2 en los caucásicos, el DQw3 es el alelo de complementación en los mexicanos. Esto podría deberse a diferencias de frecuencias génicas entre ambos grupos étnicos.

Son más frecuentes los individuos heterocigotos DQw1/DQw3 tanto en la producción de autoanticuerpos como también en los pacientes con LEG si se comparan con los controles mexicanos ($RM = 2.8$, I.C. 95% = 1.3-6.2, $p = 0.005$).

De hecho, esta relación fue la única que se asoció tanto a la producción de autoanticuerpos como en la susceptibilidad al LEG en este estudio.

Aún no se han definido con precisión a los genes responsables de estas asociaciones de autoanticuerpos con HLA, ya sean DR, DQ, genes del complemento, o de los loci A o B. Tampoco está claro por qué hay una aparente discrepancia en los diferentes estudios (en otras poblaciones) de relación del HLA con LEG y con

autoanticuerpos. Estas diferencias pueden deberse a diversas causas como son: diferencias en la genética de las poblaciones (que incluye el factor de la heterogeneidad genética de la población mestiza mexicana), o a la presencia de otros factores (como los ambientales) en esta población. Es más, es posible que varios loci del HLA y/o alelos estén actuando en concierto. Aún así, la segregación inconsistente de los haplotipos del HLA con el LEG, otras enfermedades autoinmunes y anomalías serológicas en familias múltiples (es decir, con más de un caso con LEG) (68) implica que también se necesitan de otros genes no unidos al HLA para el desarrollo del LEG. De modo que el HLA podría estar actuando como un modificador de otros genes "inmunorregulatorios", quizás a través de la promoción de ciertas respuestas de autoanticuerpos, que a su vez producen las lesiones clínicas características del LEG.

Podría postularse que uno o unos antígenos específicos se unen con una alta afinidad a la estructura precisa de las moléculas clase II asociadas al lupus eritematoso. Esto podría dar lugar a una presentación de antígeno inadecuada y a activación de células T, dando así lugar a una respuesta inmune excesiva. Sin embargo, la naturaleza exacta de los antígenos (propios o extraños) permanece aún enigmática, así como la influencia potencial del repertorio de receptores de células T. De cualquier manera, el conocimiento actual es aún insuficiente para construir una representación definitiva de las estructuras trimoleculares que están involucradas en el control de la respuesta inmune (SPH-antígeno-receptor de célula T) de modo que se pueda explicar con mayor precisión los fenómenos observados.

El objetivo de este trabajo fue analizar la genética del LEG, medida en el polimorfismo del SPH y su relación con la respuesta inmune medida mediante la expresión de los autoanticuerpos que caracterizan a esta enfermedad. Este análisis nos permite concluir que posiblemente los antígenos del HLA-DR tienen un papel en el mecanismo que causa que un individuo desarrolle LEG, mientras que los productos del HLA-DQ parecen asociarse con la producción de autoanticuerpos, y por tanto posiblemente con las manifestaciones clínicas de la enfermedad. Esto distingue el papel del SPH en autoinmunidad del relacionado con enfermedad autoinmune, dos fenómenos que tienden a ocurrir juntos en los pacientes con lupus eritematoso generalizado, pero, como se discutió en este trabajo, parecen generarse a partir de mecanismos diferentes.

← centrómero

Mapa genético del SPH

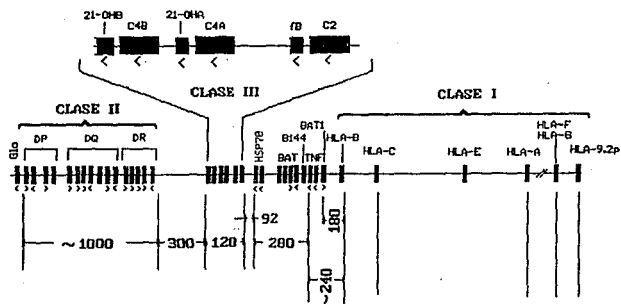


Fig. 1

Figura 1. Mapa genético del sistema principal de histocompatibilidad. Se muestra la distribución de los genes de clase I, II y III en el brazo corto del cromosoma 6 del humano. HSP70 es la proteína de choque térmico, los genes BAT y B144 son de función aún no conocida. TNF es el gene del factor de necrosis tumoral. La parte inferior de la figura muestra la distancia entre los genes, en número de kilobases (77, 78).

TABLA I.
FRECUENCIAS DE ANTIGENOS DEL HLA, HAPLOTIPOS Y COMLOTIPOS EN PACIENTES CON LEG.

TABLA Ia.
FRECUENCIAS FENOTIPICAS DE LOS ANTIGENOS (Ag) DEL HLA EN 92 PACIENTES CON LEG.

CLASE I			CLASE II			CLASE III		
Ag	N	Frecuencia	Ag	N	Frecuencia	Ag	N	Frecuencia
A2	46	0.500	DR7	33	0.359	FBS	79	0.859
A9	23	0.250	DR4	30	0.326	FBF	22	0.239
A1	19	0.207	DR3	26	0.283	FBF1	5	0.054
A19	16	0.174	DR2	15	0.163	FBS1	1	0.011
A3	14	0.152	DR1	13	0.141	FBX	10	0.109
A10	13	0.141	DR5	12	0.130			
A28	11	0.120	DR6	11	0.120	C2C	78	0.848
A11	9	0.098	DR8	7	0.078	C2B	1	0.011
AX	14	0.152	DR9	1	0.011	C2X	14	0.152
			DRX	15	0.163			
B12	18	0.196				C4A3	73	0.793
B35	18	0.196	DQw3	51	0.554	C4A0	26	0.283
B5	17	0.185	DQw1	47	0.511	C4A4	14	0.152
B7	14	0.152	DQw2	28	0.304	C4A2	9	0.098
B14	12	0.130	DQwX	23	0.250	C4A5	1	0.011
B8	11	0.120				C4A6	1	0.011
B15	10	0.109	DRw52	58	0.630	C4AX	14	0.152
B21	10	0.109	DRw53	51	0.554			
B16	8	0.087	DRwX	29	0.315			
B17	8	0.087				C4B1	76	0.826
B40	8	0.087				C4B0	20	0.217
B22	7	0.076				C4B2	18	0.196
B27	6	0.065				C4B3	2	0.022
B18	4	0.043				C4B4	1	0.011
B13	3	0.033				C4BX	14	0.152
B48	3	0.033						
B41	2	0.022				GLO2	63	0.685
BX	12	0.130				GLO1	28	0.304
						GLOX	23	0.250
C4	10	0.109						
C6	8	0.087						
C3	4	0.043						
C1	5	0.054						
C2	1	0.011						
C5	2	0.022						
C7	2	0.022						
C8	1	0.011						
CX	74	0.804						

TABLA Ib.
FRECUENCIAS GENICAS DEL HLA, COMLOTIPOS Y HAPLOTIPOS EN LOS PACIENTES A LOS QUE SE ESTUDIO SU FAMILIA (N=71 PACIENTES).
N=142 CROMOSOMAS

CLASE I			CLASE II			CLASE III		
Ag	N	Frecuencia	Ag	N	Frecuencia	Ag	N	Frecuencia
A2	41	0.289	DR7	32	0.254	FBS	114	0.808
A9	22	0.155	DR4	27	0.190	FBF	16	0.1127
A1	17	0.120	DR3	24	0.169	FBF1	2	0.0141
A19	16	0.113	DR2	14	0.099	FBX	10	0.0704
A3	14	0.099	DR1	12	0.085			
A10	11	0.078	DR5	12	0.085	C2C	129	0.9085
A11	9	0.063	DR6	10	0.070	C2B	1	0.0070
A28	9	0.063	DR8	6	0.042	C2X	12	0.0845
AX	3	0.021	DRX	5	0.035			
						C4A3	86	0.6035
B35	17	0.120	DQw1	52	0.366	C4A0	24	0.1690
B5	15	0.106	DQw3	50	0.352	C4A4	12	0.0845
B12	15	0.106	DQw2	30	0.211	C4A2	8	0.0563
B7	13	0.092	DQwX	10	0.070	C4A5	1	0.0070
B14	10	0.070				C4A6	1	0.0070
B15	9	0.063	DRw52	73	0.514	C4AX	12	0.0845
B8	8	0.056	DRw53	55	0.387			
B17	8	0.056	DRwX	14	0.099	C4B1	94	0.6680
B21	8	0.056				C4B0	18	0.1288
B40	8	0.056				C4B2	15	0.1065
B22	7	0.049				C4B3	2	0.0141
B27	6	0.042				C4B4	1	0.0070
B16	4	0.028				C4BX	12	0.0845
B18	4	0.028						
B48	3	0.021				GLO2	84	0.5945
B13	2	0.014				GLO1	29	0.2042
B41	2	0.014				GLOX	29	0.2042
BX	3	0.021						
C4	15	0.106						
C6	13	0.092						
C3	9	0.063						
C1	8	0.056						
C5	4	0.028						
C7	4	0.028						
C2	3	0.021						
C8	2	0.014						
CX	84	0.592						

X representa al número de individuos que no se tipificaron.

TABLA Ic.
FRECUENCIAS DE COMPLOTIPOS (N=142 CROMOSOMAS).

COMPLOTIPO	N	FRECUENCIA
SC31	56	0.395
SC01	22	0.155
SC42	10	0.070
FC31	9	0.063
SC30	9	0.063
FC30	5	0.035
SC30	4	0.028
SC21	3	0.021
SC32	3	0.021
SC20	2	0.014
SC33	2	0.014
F1C30	2	0.014
FC01	1	0.007
SB42	1	0.007
SC04	1	0.007
SC22	1	0.007
SC41	1	0.007
SC51	1	0.007
SC61	1	0.007
XXXX	12	0.085

XXXX = representa a los individuos que no se tipificaron

TABLA Id.
FRECUENCIAS DE LOS HAPLOTIPOS B-DR (N=142 CROMOSOMAS). SE MUESTRAN AQUELLOS CON FRECUENCIAS MAYORES AL 2.0%.

HAPLOTIPO	N	FRECUENCIA HAPLOTIPICA
B8 DR3	7	0.0493
B17 DR7	7	0.0493
B35 DR5	6	0.0423
B15 DR4	6	0.0423
B12 DR7	6	0.0423
B40 DR4	5	0.0352
B7 DR7	5	0.0357
B14 DR1	4	0.0281
B35 DR4	4	0.0281
B22 DR6	3	0.0211
B18 DR3	3	0.0211
B5 DR6	3	0.0211
B5 DR2	3	0.0211
B14 DR7	3	0.0211
B5 DR4	3	0.0211
B12 DR4	3	0.0211
BX DRX	3	0.0211

X representa a los individuos no tipificados

TABLA Ia.
FRECUENCIAS GENICAS DE LOS HAPLOTIPOS DR-COMPLOTIPO. (N=142 CROMOSOMAS)

HAPLOTIPO	N	FRECUENCIA GENICA
DR4 SC31	12	0.0845
DR7 SC31	11	0.0775
DR3 SC01	7	0.0493
DR6 SC31	7	0.0493
DR2 SC31	6	0.0422
DR4 SC01	6	0.0422
DR7 SC01	6	0.0422
DR3 SC31	6	0.0422
DR5 SC31	5	0.0352
DR8 SC31	4	0.0282
DR7 FC31	3	0.0211
DR5 SC42	3	0.0211
DR7 FC30	3	0.0211
DR4 SC30	3	0.0211
DR1 SC31	3	0.0211

TABLA II.
FRECUENCIAS GENICAS DE LOS HAPLOTIPOS EXTENDIDOS B- DR-COMPLOTIPOS. (N=142 CROMOSOMAS). (SOLO SE MUESTRAN AQUELLOS CON FRECUENCIAS MAYORES AL 2.0%).

HAPLOTIPO	N	FRECUENCIA
B8 DR3 SC01	7	0.0493
B5 DR6 SC31	3	0.0211
B15 DR4 SC01	3	0.0211
B15 DR4 SC31	3	0.0211
B17 DR7 SC01	3	0.0211
B35 DR5 SC42	3	0.0211
B17 DR7 XXXX	2	0.0141

XXXX representa a los individuos no tipificados para complotipo

TABLA Ig.
FRECUENCIAS GENICAS DE LOS HAPLOTIPOS EXTENDIDOS A-B- DR-COMPLITOS. (N= 142 CROMOSOMAS). (SOLO SE MUESTRAN AQUELLOS CON FRECUENCIAS MAYORES AL 2.0%).

HAPLOTIPO	N	FRECUENCIA
A1 B6 DR3 SC01	5	0.0352
A2 B35 DR5 SC42	3	0.0211
A19 B15 DR4 SC01	3	0.0211

TABLA Ih.
FRECUENCIAS GENICAS DE LOS HAPLOTIPOS B-COMPLITO EN 71 PACIENTES CON LUPUS ERITEMATOSO GENERALIZADO. (SOLO SE MUESTRAN AQUELLOS CON FRECUENCIAS MAYORES A 2.0%).

HAPLOTIPO	N	FRECUENCIA
B5 SC31	12	0.0845
B7 SC31	9	0.0634
B8 SC01	7	0.0493
B12 FC31	5	0.0352
B15 SC31	4	0.0282
B22 SC31	4	0.0282
B27 SC31	4	0.0282
B35 SC31	4	0.0282
B40 SC31	4	0.0282
B12 FC30	3	0.0211
B12 SC31	3	0.0211
B14 SC31	3	0.0211
B15 SC01	3	0.0211
B17 SC01	3	0.0211
B21 SC31	3	0.0211
B35 SC42	3	0.0211

TABLA II.
ANTIGENOS DE HISTOCOMPATIBILIDAD QUE SON ESTADISTICAMENTE DIFERENTES EN LEG EN
COMPARACION CON LA POBLACION NORMAL.**

Ag	ANTIGENO DEL HLA				RM	I.C. 95%	p	p real* FE
	+		-					
	LEG	CTL	LEG	CTL				
A3	14	6	64	78	2.8	(0.9-8.6)	0.043	0.344 0.115
B7	14	6	68	70	2.8	(0.9-8.6)	0.043	0.688 0.112
B8	11	4	69	80	3.2	(0.9-14.3)	0.046	0.736 0.095
B16	8	23	72	61	0.3	(0.1-0.8)	0.005	0.074 N.A.
DR3	26	9	51	78	4.3	(1.8-10.9)	0.0003	0.024 0.259
DQw1	47	43	22	42	2.1	(1.0-4.3)	0.029	0.087 0.357
DRw52	58	40	5	35	10.2	(3.2-32.5)	<0.001	<0.001 0.830
SG01	22	16	43	22	2.2	(1.0-5.0)	0.037	0.296 0.185
DQw1/DQw3	34	17	35	49	2.8	(1.3-6.2)	0.005	0.030 0.317

** Estas comparaciones de frecuencias fenotípicas se hicieron mediante prueba de χ^2 .

*La p real se obtuvo multiplicando la p por el número de alelos probados: 6 para A, 16 para B, 8 para DR, 3 para DQ, 2 para DQw, 2 para GLO, 8 para los genotipos y 6 para la combinación de DQ/DQ. CTL=controles, RM=razón de momios, I.C. 95%=intervalo de confianza al 95%, FE=fracción etiológica, N.A.=no se aplica

TABLA III.
FRECUENCIA DE AUTO-ANTICUERPOS EN 92 PACIENTES CON LEG

Ac	3 D.E.		5 D.E.	
	N	%	N	%
ANA	52	56.5	31	33.7
DNP	33	35.9	22	23.9
DNACd	31	33.7	14	15.2
DNACs	42	45.7	22	23.9
ENA	38	41.3	23	25.0
RNP	21	22.8	7	7.6
Sm	24	26.1	13	14.1
SSA	18	19.8	5	5.5
SSB	10	10.9	5	5.4
CL	18	19.6	6	6.5
RNA	34	37.0	14	15.2
MIT	7	7.6	3	3.3
HIS	39	45.3	19	22.1
SA1	9	9.8	5	6.0
16/β	11	12.0	4	4.3

N, número de sujetos positivos a los anticuerpos

Ac, anticuerpo

ENA, anticuerpos anti-antígenos extraíbles del núcleo

CL, cardiolipina

HIS, histonas

MIT, mitocondrial

3 D.E., 5 D.E., punto de corte de los niveles de los anticuerpos: 3 y 5 desviaciones estándar (D.E.) por arriba de la media de los controles.

TABLA IV.
ASOCIACIONES (RAZON DE MOMIOS) DE LOS AUTOANTICUERPOS CON EL HLA*.

HLA-Ac	Ag HLA				RM	IC 95%	p	p real	FE
	Ac+	Ac-	Ac+	Ac-					
B5-MIT	4	12	2	64	10.7	(1.8-64.9)	0.012	0.204	0.604
B7-RNP	7	7	13	55	4.2	(1.1-16.8)	0.035	0.595	0.287
B7-Sm	7	7	14	54	3.9	(1.0-15.1)	0.039	0.663	0.248
B12-ANA	15	3	32	30	4.7	(1.1-22.8)	0.017	0.289	0.251
B12-HIS	11	4	21	38	5.0	(1.2-21.5)	0.008	0.136	0.275
DR2-ANA	12	3	35	31	3.54	(0.8-21.1)	0.058	0.464	0.183
DR3-ANA	10	18	37	16	0.2	(0.1-0.7)	0.003	0.024	N.A.
DR3-DNAcs	8	20	30	23	0.3	(0.1-0.9)	0.017	0.136	N.A.
DR3-RNP	3	25	17	36	0.25	(0.04-1.0)	0.035	0.280	N.A.
DR6-Sm	6	5	15	55	4.4	(1.0-20.6)	0.030	0.240	0.221
DR6-SSA	5	6	12	57	4.0	(0.8-18.3)	0.049	0.392	0.221
DRw53-RNP	18	41	1	19	8.3	(1.1-365.5)	0.031	0.062	0.833
DRw53-Sm	19	40	1	19	9.0	(1.2-394.4)	0.016	0.032	0.844
DRw53-RNA	26	33	3	17	4.5	(1.1-25.9)	0.021	0.041	0.697
DQw1-ANA	35	15	12	18	3.5	(1.2-10.2)	0.009	0.027	0.532
GLO1-ENA	16	12	11	31	3.8	(1.2-11.9)	0.010	0.020	0.437
GLO1-18/6	9	16	1	36	20.3	(2.4-911.4)	0.0007	0.001	0.858

*Como punto de corte de los anticuerpos se definió a los valores por arriba de la media de los controles más 3 desviaciones estándar.

La p real (o p corregida) se obtuvo multiplicando la p por el número de alelos probados: por 17 para B, 6 para DR, 3 para DQ, 2 para GLO

TABLA V.
ASOCIACIONES SIGNIFICATIVAS ENTRE ANTIGENOS DEL HLA Y CONJUNTOS DE ANTICUERPOS
(PUNTO DE CORTE 3 DESVIACIONES ESTANDAR):

HLA-Ac	Ag HLA				RM	IC 95%	p	p real	FE
	+		-						
	Ac+	Ac-	Ac+	Ac-					
B7-Sm/RNP	9	5	21	45	3.9	(1.0-16.3)	0.024	0.408	0.223
B35-Sm/RNP	2	16	28	34	0.15	(0.02-0.75)	0.009	0.153	N.A.
B35-Sm/RNP/Ro/La	3	14	30	32	0.23	(0.04-0.95)	0.024	0.408	N.A.
DR3-Ro/La	3	23	16	34	0.3	(0.05-1.15)	0.052	0.116	N.A.
DR3-ANA/DNP/DNA	13	13	39	12	0.3	(0.1-0.9)	0.020	0.160	N.A.
DQw2-Ro/La	3	24	13	28	0.3	(0.05-1.2)	0.052	0.108	N.A.
DRw53-Sm/RNP	24	27	1	12	10.7	(1.3-235.9)	0.010	0.020	0.871
DRw53-Sm/RNP/Ro/La	25	26	1	10	9.6	(1.1-215.6)	0.018	0.036	0.861

La primera columna muestra los antígenos del HLA y el conjunto de anticuerpos a los que se relacionaron.

RM, razón de momios. FE, fracción etiológica. Ro es anticuerpo anti-SSA, La es anticuerpo anti-SSB.

TABLA VI.
ASOCIACIONES (CHI-CUADRADA Y RAZON DE MOMIOS) EN LOS AUTO-ANTICUERPOS CON EL
HLA. PUNTO DE CORTE: MEDIA DE LOS NORMALES MAS 5 DESVIACIONES ESTANDAR.

HLA-Ac	Ag HLA				RM	IC 95%	p	p real	FE
	+		-						
	Ac+	Ac-	Ac+	Ac-					
B5-SSB	3	13	2	64	7.4	(1.1-48.7)	0.049	0.833	0.519
B14-SSB	3	9	2	68	11.3	(1.7-77.3)	0.021	0.357	0.547
B17-RNA	4	5	10	63	5.0	(1.2-22.0)	0.042	0.714	0.229
B27-ENA	4	2	16	60	7.5	(1.3-44.7)	0.029	0.493	0.173
DR1-DNAcd	5	8	7	61	5.4	(1.4-21.3)	0.021	0.168	0.339
DR3-DNAcd	1	27	11	42	0.1	(0.02-1.2)	0.049	0.392	N.A.
DR3-DNAcs	2	26	18	35	0.1	(0.03-0.7)	0.008	0.064	N.A.
DQw3-ANA	23	31	5	21	3.1	(1.0-9.5)	0.041	0.123	0.556
DRw53-ANA	24	35	3	17	3.9	(1.0-14.7)	0.038	0.076	0.661
C4B0-RNP	4	16	2	56	7.0	(1.2-41.8)	0.035	0.175	0.571
C4B0-CL	3	17	1	57	10.1	(1.0-103.1)	0.050	0.150	0.676
GLO1-ANA	14	14	11	31	2.8	(1.0-7.7)	0.043	0.086	0.360
GLO1-DNAcs	10	18	5	37	4.1	(1.2-13.8)	0.018	0.036	0.504
GLO1-ENA	11	17	7	35	3.2	(1.1-9.8)	0.035	0.070	0.420

La p real se obtuvo multiplicando la p por el número de alelos probados: por 17 para B, 8 para DR, 3 para DQ, 2 para GLO, 5 para C4B, 2 para DP.
 FE, fracción etiológica.

TABLA VII.
ASOCIACIONES SIGNIFICATIVAS EN HETEROCIGOTOS Y EN SUJETOS CON DIFERENTES
COMBINACIONES DR/DQ:

PUNTO DE CORTE: 3 DESVIACIONES ESTANDAR.

COMBINACION DE Ag HLA-Ac	Ag HLA				RM	IC 95%	p	p corregida	FE
	+		-						
	Ac+	Ac-	Ac+	Ac-					
HETEROCIGOTOS									
DR4/DR5-ANA	0	4	46	27	0.0	(0.0-0.97)	0.023	0.598	N.A.
DQw1/DQw3-ANA	25	9	17	18	2.9	(0.96-9.2)	0.035	0.210	0.390
COMBINACIONES DR/DQ:									
DR3/DQw2-DNAcs	2	13	29	25	0.13	(0.01-0.7)	0.006	0.108	N.A.
DR6/DQw1-ANA	7	0	33	29	12.3	(1.1-Infinito)	0.019	0.361	0.161
NULO-DNP	10	31	18	19	0.3	(0.1-0.98)	0.027		N.A.

PUNTO DE CORTE: 5 DESVIACIONES ESTANDAR

COMBINACION DE Ag HLA-Ac	Ag HLA+		Ag HLA-		RM	IC 95%	p	p real	FE
	Ac+	Ac-	Ac+	Ac-					
	NULO-DNP	5	36	13					
DQw1/DQw3-ANA	17	17	8	27	3.4	(1.1-10.9)	0.020	0.120	0.480
DQw1/DQw3-DNP	11	23	4	31	3.7	(0.9-17.7)	0.036	0.218	0.535
DQw1/DQw3-DNAcd	8	26	2	33	3.7	(0.9-17.7)	0.045	0.270	0.584
DQw1/DQw3- CANA	20	14	11	24	3.1	(1.0-9.5)	0.023	0.138	0.437
DR4/DR8-DNP	4	1	14	58	16.8	(1.4-829.5)	0.010	0.234	0.209
DR4/DR6- DNAcs	4	1	15	57	15.2	(1.3-761.1)	0.012	0.192	0.197
DR4/DR6- ENA	4	1	16	56	14.0	(1.2-701.2)	0.015	0.240	0.166
DR4/DR6- SM	3	2	8	64	12.0	(1.1-154.9)	0.019	0.304	0.250
DR7/DR1-SSA/SSB	3	3	6	64	10.7	(1.1-83.6)	0.020	0.320	0.302
SC30- SSA	3	6	1	54	27.0	(1.6-1441.5)	0.007	0.042	0.722
SC30- CL	2	7	1	55	15.7	(0.7-942.8)	0.048	0.288	0.634

NULO se refiere a la presencia de alelos nulos en C4A y/o en C4B. RM, razón de momos. FE, fracción etiológica. La p corregida (p real) se obtuvo multiplicando la p obtenida a través de χ^2 por el número de comparaciones realizadas (17 para HLA-DR/DR, 6 para HLA-DQ/DQ, y 16 para HLA-DR/DQ).

BIBLIOGRAFIA

1. Ahlbom A, Staffan N. En Fundamentos de Epidemiología. Editado por Siglo XXI editores, México, D.F.
2. Alarcón-Segovia D. 1984. The pathogenesis of immune dysregulation in systemic lupus erythematosus: a trioka. *J Rheumatol* 11:588-590.
3. Alarcón-Segovia D. 1988. Systemic lupus erythematosus. Pathology and pathogenesis. En: Primer on the Rheumatic Diseases, Editor: Schumacher R, Jr., MD. Springer-Verlag Arthritis Foundation Atlanta Georgia. Novena edición. Capítulo 18 pp 96-111.
4. Alarcón-Segovia D, Fishbein E. 1968. Variations in incidence of anti-nuclear factors (ANF) to nine calf thymus nuclear antigens in normal human subjects. *Arthritis Rheum* 11:462.
5. Alarcón-Segovia D, Granados J. 1989. Immunogenetics of SLE in Mexicans. Proceedings of the Second International Conference on Systemic Lupus Erythematosus 26 al 30 de noviembre de 1989, Singapur. Professional Postgraduate Services International p 50-51.
6. Alper CA. 1976. Inherited structural polymorphism in human C2: evidence for genetic linkage between C2 and Bf. *J Exp Med* 144:1111-1115.
7. Alper CA, Boenish T, Watson L. 1972. Genetic polymorphism in human glycine-rich beta glycoprotein. *J Exp Med* 135: 68-80.
8. Altman DM, Sansom D, Marsh SGE. 1991. What is the basis for HLA-DQ associations with autoimmune disease? *Immunology Today* 12(8): 267-270.
9. Alvarellos A, Ahearn JM, Provost TT, Dorsch CA, Stevens MB, Bias W, Arnett FC. 1983. Relationships of HLA-DR and MT antigens to autoantibody expression in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* (Carta al editor) 26:1533-1535.
10. Arnett FC. 1985. HLA and genetic predisposition to lupus erythematosus and other dermatologic disorders. *J Am Acad Dermatol* 13:472-481.
11. Arnett FC. 1991. Immunogenetic features of some cases of immune-mediated skin diseases. *J Autoimmunity* 4:97-112.

12. Arnett FC, Bias W, McLean R, Engel M, Duvic M, Goldstein R, Freni-Titulaer L, McKinley TW, Hochberg MC. 1990. Connective tissue disease in southeast Georgia. A community based study of immunogenetic markers and autoantibodies. *J Rheumatol* 17:1029-1035.
13. Arnett FC, Hamilton RG, Reveille JD, Bias W, Harley JB, Reichlin M. 1992. Genetic studies of Ro (SS-A) and La (SS-B) autoantibodies in families with systemic lupus erythematosus and Primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 32 (4):413-419.
14. Awdeh ZL, Alper CA. 1980. Inherited structural polymorphism of the fourth component of human complement (C4). *Proc Natl Acad Sci USA* 77:3576-3580.
15. Awdeh ZL, Raum D, Alper CA. 1979. Genetic polymorphism of the fourth component of human complement: detection of heterozygotes. *Nature* 282: 205-207.
16. Bell DA, Maddison PJ. 1980. Serologic Subsets in systemic lupus erythematosus. An examination of autoantibodies in relationship to clinical features of disease and HLA antigens. *Arthritis Rheum* 23(11): 1268-1273.
17. Bodmer WF, Batchelor JR, Bodmer JG, Festenstein H, Morris PJ, editors. Histocompatibility Testing 1977. Munksgaard, Copenhagen, 1078; p.612.
18. Bodmer JG, Kennedy LJ, Lindsay J, Wasik AM. 1987. Applications of serology and the ethnic distribution of three locus HLA haplotypes. *Brit Med Bull* 43 (1): 37-49.
19. Campbell RD, Law A, Reid KBM, Sim, R. 1988. Structure, organization, and regulation of the complement genes. *Ann Rev Immunol* 6:161-195.
20. Charron D. 1990. Molecular basis of human leukocyte antigen class II disease associations. *Adv Immunol* 48:107-159.
21. Doherty D, Ireland R, Demaine A, Wang F, Veerapan K, Welsh K, Vergani D. 1992. Major histocompatibility genes and susceptibility to SLE in southern Chinese. *Lupus* 1 (suplemento 1):130.
22. Dunham I, Sargent CA, Trowsdale J, Campbell RD. 1987. Molecular mapping of the human major histocompatibility complex by pulsed-field gel electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:7237-7241.
23. Firer M, Shoenfeld Y, Isenberg DA, Sior H. 1988. The use of ELISA for the measurement of autoantibodies to nuclear antigens: comparison with other methodologies. *Isr J Med Sci* 24:747-751.
24. Fujisaku A, Barto Frank M, Neas B, Reichlin M, Harley JB. 1990. HLA-DQ gene complementation and other histocompatibility relationships in man with the anti-Ro/SSA autoantibody response of systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 86:606-611.
25. Germain RN. 1986. Analysis of the expression and function of class-II major

histocompatibility complex-encoded molecules by DNA mediated gene transfer. *Ann Rev Immunol* 4:281-315.

26. Green JR, Montasser M, Woodrow JC. 1986. The association of HLA-linked genes with systemic lupus erythematosus. *Am Hum Genet* 50:93-96.

27. Hamilton RG, Harley R, Blas W, Roebber M, Reichlin M, Hochberg MC, Arnett FC. 1988. Two Ro (SS-A) responses in systemic lupus erythematosus. Correlation of HLA-DR/DQ specificities with quantitative expression of Ro (SS-A) autoantibody. *Arthritis Rheum* 31(4):496-505.

28. Harley JB, Reichlin M, Arnett FC, Alexander EL, Blas W, Provost T. 1986. Gene interaction at HLA-DQ enhances autoantibody production in primary Sjogren's syndrome. *Science*. 232:1145-1147.

29. Harley JB, Sestak AL, Willis LG, Man Fu S, Hansen JA, Reichlin M. 1989. A model for disease heterogeneity in systemic lupus erythematosus. Relationships between histocompatibility antigens, autoantibodies and lymphopenia or renal disease. *Arthritis Rheum* 32 (7):826-836.

30. Hartung K, Albert E, Baur M, Kalden J, Lakomek HJ, Peter HH, Schendel D, Schneider P, Stangel W, Deicher H, and the members of the SLE study group. 1992. MHC alleles and SLE-results of a multicenter family study. Third International Conference on Systemic Lupus Erythematosus. *Lupus* 1 (suplemento 1):33.

31. Hartung K, Ehrfeld H, Kalden J, Lakomek HJ, Peter H, Schendel D, Schneider P, Seelig H, Müller R, de Lange G, Deicher H, and the members of the SLE study group. 1992. The genetics of autoantibody formation in SLE- results of a multicenter study. *Lupus* 1 (suplemento 1):103.

32. Hartung K, Ehrfeld H, Lakomek HJ, Coldway R, Lang B, Krapf F, Müller R, Schendel D, Deicher H, Seelig HP, and the members of the SLE study group. 1992. The genetic basis of Ro and La antibody formation in systemic lupus erythematosus. Results of a multicenter study. *Rheumatol Int* 11:243-249.

33. Hartung K, Fontana A, Klar M, Krüppner H, Jörgens K, Lang B, Peter H, Pichler W, Schendel D, Robin-Winn M, Deicher H. 1989. Association of class I, II and III MHC gene products with systemic lupus erythematosus. Results of a Central European multicenter study. *Rheumatol Int* 9:13-18.

34. Hess EV. 1981. Introduction to drug related lupus. Kroc Foundation Conference on Drug Induced Lupus. *Arthritis Rheum* 24:979.

35. Hochberg MC. 1987. The application of genetic epidemiology to systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 14:867-869.

36. Hochberg MC. 1990. Genetic Epidemiology of SLE. Proceedings of Second

International Congress on SLE (Singapore). pp. 9-13.

37. De Horatius RJ, Pillarisetty R, Messner RP, Talaí N. 1975. Antinucleic acid antibodies in systemic lupus erythematosus patients and their families: incidence and correlation with lymphocytotoxic antibodies. *J Clin Invest* 56:1149-1154.

38. Isenberg DA, Shoenfeld Y, Madaio M, Rauch J, Reichlin M, Stollar D, Schwartz R. 1984. Anti-DNA antibody Idiotypes in SLE. *Lancet* 2:417-422.

39. Jones H, Doherty D, Ireland R, Senaldi G, Wang F, Khamashta M, Bellingham A, Veerapan K, Hughes GRV, Vergani D. 1992. Major histocompatibility complex (MHC) genes and susceptibility to autoantibody production in southern Chinese with SLE. *Lupus* 1 (suplemento 1):130.

40. Jones DR, Rushton L. 1982. Simultaneous inference in epidemiological studies. *Int J Epidemiol* 11: 276-282.

41. Kaneoka H, Hsu K-C, Takeda Y, Sharp G, Hoffman. 1992. Molecular genetic analysis of HLA-DR and HLA-DQ genes among anti-U1-70-kd autoantibody positive connective tissue disease patients. *Arthritis Rheum* 35 (1):83-94.

42. Kaplan D. 1984. The onset of disease in twins and siblings with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 11:648-652.

43. Koller BH, Geraghty DE, Shimizu Y, De Mars R, Orr HT. 1988. HLA-E: A novel HLA class I gene expressed in resting T lymphocytes. *J Immunol* 141 (3): 897-904.

44. Kompf J et al. 1975. Polymorphism of red cell glyoxalase I (E.C.4.4.1.5). A new genetic marker in man. Investigation of 169 mother-child combinations. *Hum Genet* 27:141-143.

45. Kumar A, Kumar P, Schur P. 1992. Strong association of HLA- DRB3*0101 (DRw52a) with Systemic Lupus Erythematosus. Third International Conference on Systemic Lupus Erythematosus. *Lupus* 1 (suppl 1):32.

46. Lange A, Sedzimirská M, Jacak-Laba A, Nowakowska B, Swana G, Kilmczac A, Laba C. 1992. Variants of SLE: differentiation on the basis of clinical symptoms, autoantibodies and HLA antigens. *Lupus* 1 (suppl 1): 124.

47. Lawrence SK, Smith CL, Srivastava R, Cantor CR, Weissman SM. 1987. Megabase scale mapping of the HLA gene complex by pulsed field electrophoresis. *Science* 235:1387-1380.

48. De Leo C, Castelán N, López M, González N, Weckmann AL, Melín-Aldana H, Vargas-Alarcón G, Bordes J, Alarcón-Segovia D, Granados J. Population analysis of class I and class II MHC loci obtained from family studies in Mexicans. (Enviado a publicación).

49. Lipmann SM, Arnett FC, Conley CL. 1982. Genetic factors predisposing to autoimmune

diseases. Autoimmune hemolytic anemia, chronic thrombocytopenic purpura and systemic lupus erythematosus. *Am J Med* 73:827-840.

50. Mauff G, Alper CA, Awdeh Z, Batchelor JR, Bertrams J, Bruunpetersen G, Dawkins RL, Demant P, Edwards J, Grossewilde H, Hauptmann G, Klouda P, Lamm L, Mollenhauser E, Neri C, Olaisen B, O'Neill G, Rittner C, Roos MH, Skanes V, Teisberg P, Wells L. 1983. Statement on the nomenclature of human C4 allotypes. *Immunobiology* 164: 184-191.

51. Miller KB, Schwartz RS. 1979. Familial abnormalities of suppressor cell function in systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 301: 803-809.

52. Nishikai M, Sekiguchi S. 1985. Relationship of autoantibody expression and HLA phenotype in Japanese patients with connective tissue diseases. *Arthritis Rheum* 28 (5):579-581.

53. Olsen NJ, Chen PP. 1991. Immunogenetics of autoantibodies and autoimmune diseases. *Current Opinion Rheumatology* 1991; 3:391-397.

54. Pande I, Singh R, Sekharan N, Kallash S, Taneja V, Mehra N, Kumar A, Malaviya A. Immunogenetics of systemic lupus erythematosus patients from North India. *Lupus* 1 (suplemento 1):70.

55. Papasteriades C, Terzoglou K, Siakotos M, Maregou M, Nikolopoulou N, Dantis P, Billis A, Athanasiadis S. 1992. Association of HLA antigens and ENA antibodies in Greek patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 1 (suplemento 1):56.

56. Petri M, McLean R, Watson R, Dulaney N, Winkelstein J. 1992. Null alleles for C4 in systemic lupus erythematosus (SLE): frequency and clinical correlates. *Lupus* 1 (suplemento 1):32.

57. Provost TT, Talaí N, Blas W, Harley J, Reichlin M, Alexander EL. 1988. Ro (SS-A) positive Sjögren's/lupus erythematosus (SC/LE) overlap patients are associated with the HLA-DR3 and/or DRw6 phenotypes. *J Invest Dermatol* 91:369-371.

58. Reveille JD, Blas W, MacLeod M, Small D, Arnett FC. 1991. The molecular genetics of systemic lupus erythematosus (SLE) in Mexican Americans. Abstract. 55th Annual Meeting American College of Rheumatology, Boston, Nov 17-21. *Arthritis Rheum* 34: c35, s138.

59. Ruiz-Arguelles G, Ruiz-Arguelles A, Alarcón-Segovia D. 1991. Possible mechanisms on the relationship of antiphospholipid antibodies and deficiencies of the protein C/S system. *Br J of Haematol* 71:568-569.

60. Sargent CA, Dunham I, Trowsdale J, Campbell RD. 1989. Human major histocompatibility complex contains genes for the major heat shock protein HSP70. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 1968-1972.

61. Savi M, Ferraccioli GF, Neri TM, Zanelli P., Dall'aglio PP, Tincani A, Balestrieri G, Carella

- G, Cattaneo R. 1988. HLA-DR antigens and anticardiolipin antibodies in northern Italian systemic lupus erythematosus patients. *Arthritis Rheum* 31 (12):1568-1570.
62. Schur P, Marcus-Bagley D, Awdeh Z, Yunis EJ, Alper CA. 1990. The effect of ethnicity on major histocompatibility complex complement allotypes and extended haplotypes in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 33 (7):985-992.
63. Schur PH, Pandey JP, Fredrick JA. 1985. Gm allotypes in white patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 28:828-830.
64. Shoenfeld Y, Armital-Teplizki H, Mendlovic S, Blank M, Mozes E, Isenberg D. 1989. The role of human anti-DNA idiotype 16/6 in autoimmunity. *Clin Immunol Immunopathol*; 51:313-325.
65. Shoenfeld Y, Isenberg DA, Rauch J, Madaio M, Stollar D, Schwartz R. 1983. Idiotypic cross reaction of monoclonal lupus autoantibodies. *J Exp Med* 158:718-730.
66. Shoenfeld Y, Rauch J, Massicotte H, Datta SK, Schwartz JA, Stollar D, Schwartz R. 1983. Polyspecificity of monoclonal lupus autoantibodies by human hybridoma. *N Engl J Med* 308: 414-420.
67. Shoenfeld Y, El-Roeiy A, Ben Yehuda O, Pick AI. 1987. Detection of antihistone activity in the sera of patients with monoclonal gammopathies. *Clin Immunol Immunopathol* 42:250-258.
68. Shoenfeld Y, Stor H, Shafir S, Krause I, Granados J, Villarreal-Molina G, Alarcón-Segovia D. 1992. The diversity and pattern of inheritance of autoantibodies in multiple case families of SLE. *Ann Rheum Dis* 51:611-618.
69. Shoenfeld Y, Vilner Y, Coates ARM, Rauch J, Lavie G, Shaul D, Pinkhas J. 1986. Monoclonal anti-DNA antibodies react with Mycobacterium tuberculosis. *Clin Exp Immunol* 66:255-261.
70. Shows TB, Alper CA, Bootsma D, Dorf M, Douglas T, Hulsman T, Kit S, Klingner HP, Kozac C, Lalley PA, Lindsley D, MacAlpine PJ, MacDougall JK, Meera Khan P, Meisler M, Morton NE, Opotz JM, Partridge CW, Payne R, Roderick TH, Rubinstein P, Ruddle FH, Shaw M, Spranger JW, Weiss K. 1979. International system for human genetic nomenclature (1979). *ISGN Cytogenet Cell Genet* 1979; 25:96-116.
71. Smolen JS, Klippel JH, Penner E, Reichlin M, Steinberg AD, Chused TM, Scherak O, Graninger W, Hartter E, Zielinski CC, Wolf A, Davey RJ, Mann DL, Mayr WR. 1987. HLA-DR antigens in systemic lupus erythematosus: association with specificity of autoantibody responses to nuclear antigens. *Ann Rheum Dis* 46:457-462.
72. Stroynowski I. 1990. Molecules related to class-I major histocompatibility complex antigens. *Ann Rev Immunol* 8:501-530.

73. Tan EM. 1989. Consideration of autoantibodies as immune imprints and reporters of the original antigenic stimulus. Proceedings of the second International Conference on Systemic Lupus Erythematosus, Professional Postgraduate Service International. Singapore 26-30 Nov 1988 pp3-6.
74. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, Schaller JG, Talal N, Winchester RJ. 1982. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 25: 1271-1277.
75. Terasaki PI, McClelland JD. 1964. Microdroplet assay of human serum cytotoxins. *Nature* 204:998-1000.
76. Terasaki PI, Bernoco D, Park MS, Ozturk G, Iwaki Y. 1978. Microdroplet testing for HLA-A, -B, -C and -D antigens. The Philip Levine Award Lecture. *Am J Clin Pathol* 69:103
77. Thomson G. 1986. Human HLA Genetics and Disease Associations. En: Handbook of experimental Immunology (3). Genetics and Molecular Biology. Editor: DM WEIR. Blackwell Scientific Publications 4a edición capítulo 102, pp 102.1- 102.12.
78. Tiwari JL and Terasaki PI. 1985. HLA and disease associations. New York Springer Verlag.
79. Trowsdale J. 1987. Genetics and polymorphism: class II antigens. *Brit Med Bull* 43 (1): 15-36.
80. Urowitz MB, Gladman DD, Tozman ECS, Goldsmith CH. 1987. The lupus activity criteria count. *J Rheumatol* 11: 783-87.
81. Van Rood JJ, Van Leeuwen A, Keuming JJ, Blusse, Van Oud EJ, Albas J. 1975. The serological recognition of the human MLC determinants using a modified cytotoxicity technique. *Tissue Antigens* 5:75-79.
82. Verrier Jones J, Jones E, Forsyth SJ, Skanes VM, Reichlin M, MacSween JM, Eastwood S, Carr RI. 1987. Familial Systemic Lupus Erythematosus: Evidence for separate loci controlling C4 deficiency and formation of antibodies to DNA, nRNP, Ro and La. *J Rheumatol* 14:263-267.
83. Villarreal-Molina G, Villa-Romero A, Alarcón-Segovia D, S Shafir, H Slor, R Bakimer, Y Shoenfeld. 1991. ¿Cuáles auto- anticuerpos se asocian a actividad clínica del lupus eritematoso generalizado? Memorias del XIX Congreso Mexicano de Reumatología San Luis Potosí, S.L.P. febrero 19-23 1991. *Rev Mex Reumatol* 6 (1) P-19, pp 12.
84. Warlow RS, Uko G, McCluskey J, Kay PH, Christensen FT, Dawkins RL. 1986. Extractable nuclear antigen (ENA) autoantibodies in SLE: an immunogenetic relationship with HLA, C4 and Bf alleles. *Clin exp Immunol* 63:419-427.
85. Watson RM, Talwar P, Alexander E, Bias WB, Provost TT. 1991. Subacute cutaneous

lupus erythematosus-Immunogenetic associations. *J Autoimmunity* 4:73-85.

86. Weckmann AL, Vargas-Alarcón G, Peralta A, López M, González N, de León C, Castelán N, Bordes J, Alarcón-Segovia D, Granados J. Absence of linkage disequilibrium between HLA-A and -B loci reflects recent panmixia among Mexicans. (Enviado a publicación).

87. Wilson WA, Pérez MC, Armatis PE, Michalski JP. 1986. IgG anticardiolipin activity (ACA) in SLE: association with null phenotypes of C4. *Arthritis Rheum* 29 (suplemento 4): s44, resumen 193.

88. Wilson RW, Provost TT, Blas WB, Alexander EL, Edlow DW, Hochberg MC, Stevens MB, Arnett FC. 1984. Sjögren's syndrome. Influence of multiple HLA-D region alloantigens on clinical and serologic expression. *Arthritis Rheum*, 27 (11):1245- 1253.

89. Winchester RJ, Núñez-Roldán A. 1982. Some genetic aspects of SLE. *Arthritis Rheum* 25:833-837.

90. Yunis EJ. MHC haplotypes in biology and medicine. 1988. Philip Levine Award Lecture. *Am J Clin Path* 89 (2): 268-2.

91. Zurgil N, Baklmer R, Sior H, Kaplan M, Moutsopoulos H, Shoenfeld Y. 1990. Pyruvate dehydrogenase as an antigen to detect antimitochondrial antibodies. *Isr J Med Sci* 26:682-685.

APENDICE

TABLA A. Frecuencias genotípicas de los antígenos (Ag) del HLA en 85 controles mestizos mexicanos.

CLASE I			CLASE II			CLASE III		
Ag	N	Frecuencia	Ag	N	Frecuencia	Ag	N	Frecuencia
A2	60	0.353	DR4	42	0.247	FBS	145	0.853
A9	25	0.147	DR7	27	0.159	FBF	22	0.129
A19	22	0.129	DR1	25	0.147	FBF1	3	0.018
A28	20	0.118	DR2	17	0.100			
A1	12	0.070	DR5	15	0.088	C2C	167	0.982
A10	9	0.053	DR8	14	0.082	C2B	3	0.018
A3	6	0.035	DR3	10	0.059			
A11	5	0.029	DR6	8	0.047	C4A3	121	0.712
AX	11	0.065	DR10	1	0.006	C4A0	22	0.129
			DRX	4	0.024	C4A4	18	0.106
B35	29	0.171				C4A2	8	0.047
B12	25	0.147	DQw3	58	0.341	C4A1	1	0.006
B16	23	0.135	DQw1	50	0.294			
B5	22	0.129	DQw2	38	0.224	C4B1	123	0.724
B40	13	0.076	DQwX	24	0.141	C4B2	28	0.164
B14	9	0.053				C4B0	18	0.094
B7	6	0.035	DRw53	71	0.418	C4B3	2	0.012
B13	6	0.035	DRw52	47	0.278	C4B4	1	0.006
B15	5	0.029	DRwX	52	0.306			
B17	5	0.029				GLO2	72	0.750
B8	4	0.024				GLO1	24	0.250
B18	3	0.018						
B21	3	0.018						
B22	3	0.018						
B27	3	0.018						
B70	3	0.018						
B53	2	0.012						
B41	1	0.006						
B48	1	0.006						
BX	4	0.024						
C1	2	0.012						
C2	2	0.012						
C4	2	0.012						
C3	1	0.006						
C6	1	0.006						
CX	162	0.952						

Nota: los alelos de G1o se obtuvieron a partir de 98 sujetos mestizos mexicanos.
 N = número de antígenos de HLA en 170 cromosomas normales (85 controles sanos).

TABLA B.
Frecuencia fenotípica de los antígenos del HLA en 85 controles sanos.

CLASE I			CLASE II			CLASE III		
Ag HLA	N	Frecuencia	Ag	N	Frecuencia	Ag	N	Frecuencia
A2	46	0.541	DR4	36	0.424	FBS	84	0.988
A9	23	0.271	DR7	25	0.294	FBF	21	0.247
A19	20	0.235	DR1	21	0.247	FBF1	3	0.035
A28	19	0.224	DR2	17	0.200			
A1	11	0.129	DR5	15	0.176	C2C	85	1.000
A10	8	0.094	DR8	12	0.141	C2B	3	0.035
A3	6	0.071	DR3	9	0.106			
A11	5	0.059	DR6	8	0.094	C4A3	81	0.953
AX	4	0.047				C4A0	22	0.259
						C4A4	16	0.188
B35	24	0.282	DQw3	50	0.588	C4A2	8	0.094
B12	23	0.271	DQw1	43	0.508	C4A1	1	0.012
B16	23	0.271	DQw2	33	0.388			
B5	20	0.235				C4B1	79	0.929
B40	13	0.153	DRw53	55	0.647	C4B2	24	0.282
B14	9	0.106	DRw52	38	0.447	C4B0	16	0.188
B7	6	0.071				C4B3	2	0.024
B13	6	0.071				C4B4	1	0.012
B16	5	0.059						
B17	5	0.059				GLO2	91	0.948
B8	4	0.047				GLO1	43	0.448
B18	3	0.035						
B21	3	0.035						
B22	3	0.035						
B27	3	0.035						
B53	2	0.024						
B41	1	0.012						
B48	1	0.012						
B70	1	0.012						
BX	1	0.012						
C1	2	0.024						
C2	2	0.024						
C4	2	0.024						
C3	1	0.012						
C6	1	0.012						
CX	79	0.929						

Nota: los alelos de GLO se obtuvieron a partir de 96 sujetos sanos, mestizos mexicanos.

TABLA C. FRECUENCIA DE AUTOANTICUERPOS EN 35 CONTROLES.

Anticuerpo	3 D.E.		5 D.E.	
	N	%	N	%
ANA	0	0.0	0	0.0
DNP	1	2.6	0	0.0
DNAcid	0	0.0	0	0.0
DNAcS	0	0.0	0	0.0
ENA	0	0.0	0	0.0
RNP	0	0.0	0	0.0
Sm	0	0.0	0	0.0
SSA	0	0.0	0	0.0
SSB	1	2.6	0	0.0
CARDIOLIPINA	0	0.0	0	0.0
RNA	1	2.6	0	0.0
MITOCONDRIAL	1	2.6	0	0.0
HISTONAS	1	2.6	0	0.0
Id SA-1	1	2.6	0	0.0
Id 16/6	1	2.6	0	0.0

N representa al número de individuos que fueron positivos a los dos puntos de corte de los autoanticuerpos que se definieron para este estudio: la media de los controles más 3 desviaciones estándar (3 D.E.) y más 5 desviaciones estándar (5 D.E.).

Ac, anticuerpo