



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO



ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
"IZTACALA"

ESTUDIO INMUNOGENETICO DE LA
ATAXIA TELANGIECTASIA

T E S I S

PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A

MA. DE LOURDES AGUIRRE ZARCO

DIRECTOR DE TESIS: DR. JULIO GRANADOS ARRIOLA



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO

Presidente : M. en C. Martha Ofelia Salcedo Alvarez

Vocal : M. en C. Sergio Vaca Pacheco

Secretario : Dr. Julio Granados Arriola

1er. suplente : M. en C. José Efraín Garrido Guerrero

2o. suplente : I.B.Q. José Abel Fuentes Toledo

**EL PRESENTE TRABAJO FUE REALI-
ZADO EN EL DEPARTAMENTO DE
INMUNOLOGIA Y REUMATOLOGIA
DEL INSTITUTO NACIONAL DE LA
NUTRICION " SALVADOR ZUBIRAN ".**

*Tu, cuya gloria cantan los cielos,
Sal. 8,2.*

*Cuando contemplo tus cielos,
hechura de tus dedos,
la luna y las estrellas
que Tú pusiste en su lugar
Sal. 8,4.*

*Por la palabra de Yahvé fueron hechos los cielos,
y todo su hornato por el soplo de su boca.
Sal. 32,6.*

*A mi futuro compañero
de mi vida ... Jaime
porque este logro
también es tuyo.
Con todo mi amor.*

*A mis padres, por el gran amor que les tengo ...
A María y a mi madre del cielo ...*

*A mis hermanos Luis, Jorge, Martha, Rosa, Eugenia,
Mónica, Verónica, Ricardo, a Javier y a todos mis sobrinos.
Y a MISHA.*

*A mis sinodales, cuyos consejos fueron muy importantes
para la redacción de este trabajo.*

***Y en forma muy especial al Dr. Julio Granados
dedico este trabajo, por su gran apoyo y sus grandes
enseñanzas. GRACIAS.***

*Y a todos mis compañeros, a todos mis alumnos,
mis familiares y a México.*

INDICE GENERAL

I RESUMEN	1
II ANTECEDENTES	2
II.1 Etiopatogenia de la Ataxia telangiectasia	
II.2 Clasificación Clínica de la Ataxia telangiectasia	
II.3 Genética de la Ataxia telangiectasia	
II.4 HLA y la Ataxia telangiectasia	
◇ Participación de las moléculas clase II	
III INTRODUCCION	7
III. 1 Sistema Principal de Histocompatibilidad	7
a).- Genes clase I	10
b).- Genes clase II	13
c).- Genes clase III	16
d).- Desequilibrio de Unión	22
IV HIPOTESIS	23
V OBJETIVOS	24
VI MATERIAL Y METODOS	25
VI.1 MUESTRA	25
VI.2 Tipificación de las moléculas clase I y II	26
VI.3 Tipificación de las moléculas clase III	36
a).- Factor B	
b).- Cuarto componente del complemento	40
c).- Segundo componente del complemento	41
VI.4 ANALISIS ESTADISTICO	44

VII RESULTADOS	46
VIII DISCUSION	47
IX CONCLUSIONES	62
X BIBLIOGRAFIA	63

CAPITULO I

RESUMEN

ATAXIA TELANGIECTASIA

I. RESUMEN

Se sospecha que existe un mecanismo molecular común que une todas las manifestaciones de la Ataxia telangiectasia (AT) y posiblemente se trata de un defecto localizado en uno de los genes de la superfamilia de las Inmunoglobulinas. Se propone que el gen de la AT codifica una proteína que es esencial para la expresión ordenada de genes pertenecientes a esta familia.

Probablemente dicho gen regula el proceso de rearreglo que parece ser muy estereotipado en este sistema de genes.

Los miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas tienen un papel preponderante en el desarrollo y en la forma de operar tanto del sistema inmune como del sistema nervioso por lo que cualquier alteración en su expresión produciría una pleyade de signos y síntomas como los que caracterizan al fenotipo de la AT.

Una de estas características es la deficiencia de la Inmunoglobulina A (IgA) la cual parece asociarse con haplotipos extendidos de Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC).

Este trabajo busca la existencia de haplotipos extendidos en pacientes mexicanos con AT.

CAPITULO II

ANTECEDENTES

II.1 Etiopatogenia de la Ataxia Telangiectasia.

II.2 Clasificación Clínica de la Ataxia Telangiectasia.

II.3 Genética de la Ataxia Telangiectasia.

II.4 HLA y la Ataxia Telangiectasia.

*** Participación de las moléculas clase II.**

II. ANTECEDENTES

Muchos de los defectos genéticos que dan lugar a deficiencia en la formación de anticuerpos y/o a la generación de reacciones de inmunidad celular fueron detectados desde 1950, momento que coincidió con el empleo antibióticos, de Inmunoglobulinas, e incluso con el empleo de injertos de médula ósea, o de Timo, procedentes de donadores normales. Los estudios de estas deficiencias inmunológicas han sido útiles para aclarar los mecanismo que intervienen en las respuestas inmunológicas normales, de forma parecida al estudio de las mutaciones que sirvieron pra establecer las numerosas vias metabólicas.

La clasificación de muchos de los síntomas clínicos resulta difícil, sin embargo es posible reconocer algunos patrones clínicos característicos como ocurre en el caso de la enfermedad llamada Ataxia Telangiectasia (AT).

La AT se considera una enfermedad hereditaria autosómica recesiva, la cual como su nombre lo indica se caracteriza por manifestaciones clínicas de ataxia cerebelosa y telangiectasias, éstas se inician desde el primer año de vida y tiene evolución progresiva e irregular.(1).

De manera consistente en estos pacientes se ha demostrado inmunodeficiencia de grado variable la cual puede condicionar problemas infecciosos, principalmente respiratorios así como también una incidencia elevada de padecimientos malignos. Los síntomas se descubren hasta la infancia, donde el niño intenta caminar, en esta etapa aún la mente no está afectada. La inmunodeficiencia se aprecia en forma de infecciones recurrentes y crónicas tanto de pulmones como de bronquios, además algunos de los pacientes sufren también de meningitis, osteomielitis ó incluso de

septicemia todo ello es característico de la inmunodeficiencia debida a hipogamaglobulinemia.

Al llegar a la adolescencia se pueden presentar anomalías endócrinas como la disgenecia gonadal, diabetes resistente a la insulina y también anormalidades de la función hepática. Estos pacientes tienen a su vez tendencia al desarrollo de linfomas, los que eventualmente son causa de muerte. El padecimiento tiene mal pronóstico, ya que el sistema nervioso central se afecta en diversas regiones, particularmente en el cerebelo, llegando por lo tanto a estados de invalidez física importantes (2). Se sabe que este trastorno es debido a un defecto de maduración que se expresa a un mismo tiempo en los diferentes Sistemas (Nervioso, Endócrino e Inmunológico) dando lugar al cuadro que caracteriza a este síndrome.

Las diferencias fundamentales entre la inmunidad celular y la humoral se han establecido a partir de estudios clínicos en pacientes con deficiencia masiva de este sistema, éstas se describen más adelante.

Esta enfermedad se hereda en forma autosómica recesiva, la anomalía afecta tanto a linfocitos T como a linfocitos B y a las células precursoras. Un 80% de los pacientes carecen de IgA sérica y secretora; las inmunoglobulinas IgM e IgG por su lado están en concentraciones normales. La concentración de IgA es tan solo de 1/5 de la concentración normal: como se sabe, en el hombre como en los otros mamíferos, la IgA es la inmunoglobulina principal en las diversas secreciones (leche, mucosa respiratoria e intestinal, saliva, lágrimas). Las células productoras de IgA se concentran en el tejido subepitelial de las glándulas exócrinas y ejercen su acción frente a los antígenos de manera local. Los anticuerpos IgA secretados parecen ser importantes para la protección de las superficies mucosas frente a la invasión de microorganismos patógenos. La IgA existe

en el suero en forma de monómero, mientras que la IgA exócina es generalmente un dímero. Después de la destrucción de los puentes disulfuro, todos los tipos de IgA tienen cadenas pesadas y ligeras en proporciones idénticas, tienen también una cadena J por cada 4 cadenas ligeras. La IgA exócina posee una cadena polipeptídica cuya función se desconoce, pero es probable que este fragmento sea responsable de la resistencia extraordinaria de la IgA a la degradación por las enzimas proteolíticas, lo que contribuiría a su persistencia en las secreciones intestinales (2). En los estudios realizados a familiares de pacientes con At se encontró que ellos tienen mayor incidencia de enfermedades con trastornos inmunes y también procesos malignos asociados con inmunodeficiencias (1) Amman y Hong, publicaron datos de la presencia de varios autoanticuerpos en el suero de la mayoría de los pacientes (3), proponiendo con ello mecanismo autoinmunes involucrados en el deterioro progresivo multisistémico, principalmente el que ocurre en el Sistema Nervioso Central. El hecho de presentar autoanticuerpos, indicaría un desequilibrio en el Sistema Inmune, el cual podría expresarse en forma de lesión tisular (1). El déficit de IgA es la anomalía inmunológica más frecuente. Esta se produce en alrededor de 0,1% de la población sin que necesariamente de lugar a manifestaciones clínicas. En ciertas familias esta anomalía se hereda en forma autosómica dominante, mientras que en otras lo hace en forma autosómica recesiva. El déficit de IgA se acompaña generalmente de anomalías genéticas autosómicas y de la delección parcial del cromosoma 18, que a su vez se asocia con enfermedades congénitas como rubeola y toxoplasmosis. A pesar de la gran diversidad de anomalías congénitas, los pacientes que presentan deficiencia de IgA, pueden presentar un número normal de linfocitos lo que sugiere un bloqueo en la

diferenciación de los linfocitos B. (2) Otro aspecto que cabe señalar en esta enfermedad es el de que la inmunidad resulte alterada. Este defecto, es el que sugirió que fuese pertinente el estudio desde el punto de vista inmunogenético, y precisamente es éste el tema del presente trabajo.

En su Conferencia Nobel de 1931, Landsteiner sugirió que "grupos sanguíneos" similares podrían intervenir en la aceptación o rechazo de tejidos trasplantados. Esta idea condujo a Gorer a identificar en ratones un grupo de antígenos cuya compatibilidad entre el animal donante y el receptor mejoraba en forma notoria la sobrevivencia del injerto, y les asignó a dichas estructuras el nombre de Antígenos de Histocompatibilidad. Se sabe que éste es el sistema genético más polimórfico de los vertebrados. Está ubicado en el humano en el brazo corto del cromosoma número 6, y en el ratón en el cromosoma 17. La capacidad que presentan ciertos ratones para producir títulos elevados de anticuerpos frente a muchos antígenos, está determinada por su Sistema de Histocompatibilidad que en el ratón se llama Sistema H2.

McDevitt demostró que la capacidad en algunas cepas de ratones para responder a ciertos antígenos, se halla relacionada con los Antígenos de Histocompatibilidad.(2,4,5) Los investigadores han encontrado Sistemas Principales de Histocompatibilidad análogos en todas las especies de mamíferos estudiados hasta ahora. Aunque el HLA fué identificado originalmente por su papel en el rechazo de trasplante, ahora se sabe que las proteínas codificadas en esta región del genoma participan en muchos aspectos del reconocimiento inmunológico, incluyendo la interacción de células de estirpe linfocítica. (4) En el Hombre el Sistema de HLA consiste de 7 Sistemas alélicos codominantes, HLA-A,B,C,DR,DP y DQ. Al producto de los loci HLA-A,B,C, se les conoce como antígenos Clase I, para

distinguirlos de la clase II, que son el HLA-DR, DP, Y DQ, ambas clases difieren en su estructura, función y distribución celular. El HLA-A,B,C,son expresados en todos los tipos celulares que poseen núcleo, mientras que los HLA-DR,DP y DQ son restringidos a ciertas formas celulares que intervienen en la respuesta inmune como los linfocitos B (2), monocitos (5) y las células endoteliales.

Las proteínas de la Clase I están compuestas por 2 polipéptidos, el polipéptidos,el polipéptido mayor es codificado por el HLA y se haya asociado en forma no covalente con el polipéptidos beta-2 microglobulina el cual es codificado fuera del HLA en el cromosoma 15 del humano. Las proteínas de la Clase II consisten de dos polipéptidos unidos también en forma no covalente, se les denomina cadena alfa y cadena beta, ambos son codificadas en el HLA. Los genes de la Clase I y Clase II del Sistema de HLA, pertenecen al llamado Complejo Principal de Histocompatibilidad, el cual incluye también a los genes de Clase III. Algunos de los componentes de la clase III son componentes del Sistema del Complemento. Un aspecto interesante del HLA, es la capacidad que tiene de controlar la respuesta inmune, que difiere en cada individuo de acuerdo a los alelos de cada uno de los genes, lo que tiene profunda influencia en la resistencia o la susceptibilidad a padecer ciertas enfermedades, en particular las enfermedades inmunológicas. (6)

III. INTRODUCCION

III.1 EL SISTEMA PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD

El sistema principal de histocompatibilidad (SPH) está formado por un grupo de genes localizados en el brazo corto del cromosoma seis humano (6p21.3) (figura 1). El sistema abarca entre tres mil y cuatro mil pares de bases nucleotídicas y se ha podido localizar gracias a estudios de electroforesis pulsada en gel implicando una electroforesis de campo con el fin de estudiar megabases de DNA (7,8,9).

Hacia el telómero se encuentra la región clase I del SPH, que tiene por lo menos 17 genes relacionados entre sí (10) y que incluye los loci HLA-A, -B y -C. Hacia el centrómero está la región clase II, que se puede dividir en cuatro subregiones (DP,DO/DZ,DQ y DR), cada una por lo menos con un par de genes alfa y beta (II). Dentro de la región clase II se incluyen los determinantes HLA-DW, los cuáles se determinan por cultivo mixto de linfocitos (12). Ente las regiones clase I y clase II, se encuentra la región clase III, cuyos genes cofifican para los componentes del complemento C2, factor B(fB), C4A y C4B, así como los genes estructurales de la 21-hidroxilasa A Y B (21-OH y 21-OHB).

Dentro del SPH se incluyen el gen de la glioxalasa I, el más centromérico de todos, los genes del factor de necrosis tumoral alfa y beta (TNF-y TNF-beta), que están entre el HLA-B y la región clase III y el gen de una proteína con estructura periódica no común llamada DR, que se encuentra entre el gen del factor B y el de C4A.

Recientemente se han encontrado otros cinco genes asociados al locus HLA-B, llamados "transcritos asociados a B", que son BAT-1,-2,-3.-4

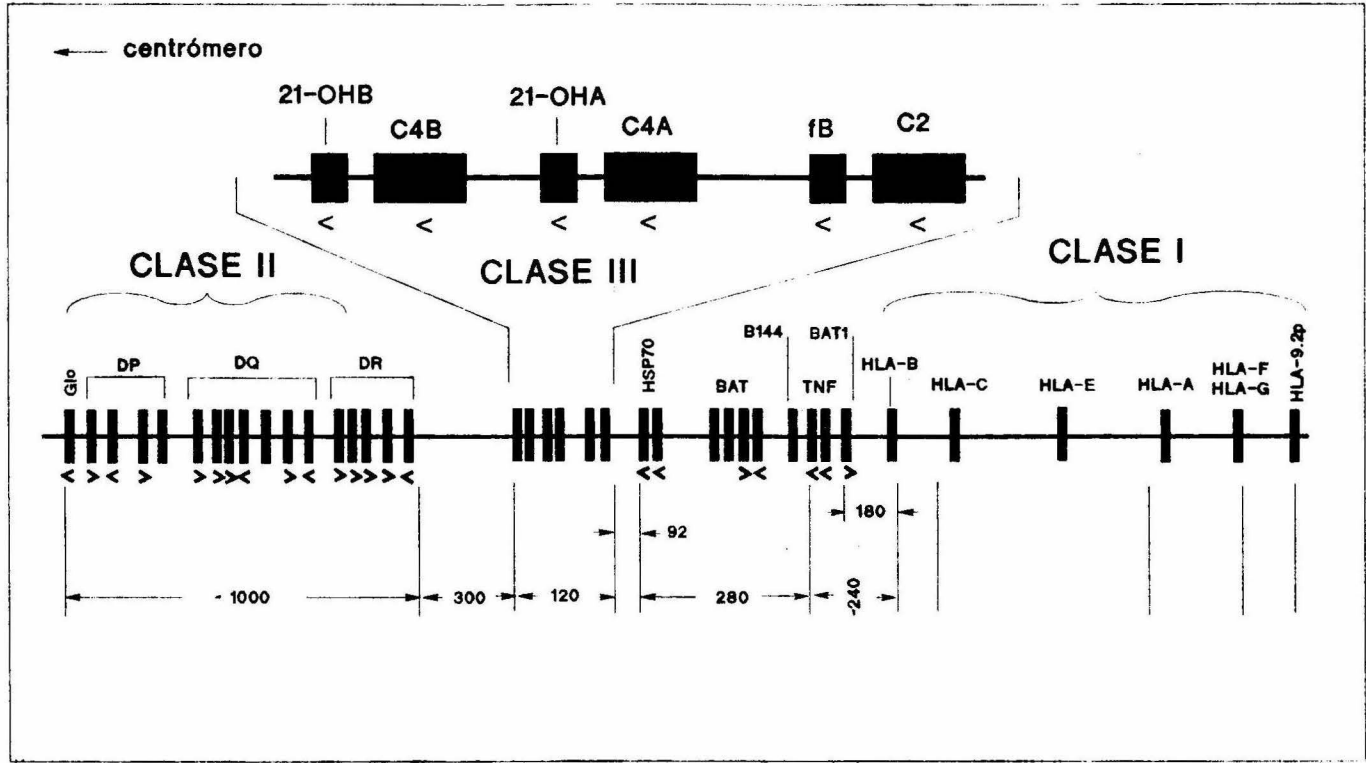


Fig. 1 Mapa genético del SHP

y -5, así como también un gen llamado B-II4 que es análogo a un gen con igual nombre que el del ratón (13). En 1989 se encontraron dos loci de la proteína de "choque térmico, HSP70-1 y HSP70-2, situado ente los genes de clase III y del factor de necrosis tumoral (9).

Los genes clase I, II y III se heredan de manera mendeliana codominante. Las moléculas clase I se expresan en la membrana de todas las células nucleadas del cuerpo, excepto en neuronas y trofoblastos maduros y son difíciles de detectar en eritrocitos. De los tres loci de clase I clásicos, HLA-A, -B y -C, el locus de C es el que menos adecuadamente se expresa. Las moléculas clase II se expresan sólo en ciertas células como macrófagos, linfocitos B, células endoteliales, células dendríticas y células de Langerhans. No se expresa en linfocitos T no activados, pero su expresión puede inducirse con mitógenos ó estímulos antígeno específico. Ni los eritrocitos maduros ni los granulocitos expresan moléculas de clase II (14).

La frecuencia de recombinación genética dentro del SPH es muy baja (menos de 2%) debido a que este conjunto de genes ocupa solamente unas 3,800 kb. el entrecruzamiento entre cromosomas homólogos que incluyan a los genes HLA-A y B ó a HLA-B y -DR ocurre una frecuencia un poco menor de 1% del total de meiosis (15). Por esta razón el complejo génico puede considerarse como una sola unidad genética.

Los alelos de los loci del SPH de un cromosoma en particular constituyen un haplotipo (el genotipo de un individuo está dado por dos haplotipos, uno de origen materno y otro de origen paterno). Una combinación dada de alelos de los loci fB, C2, C4A y C4B forman un llamado complotipo (16) o haplotipo de genes del complemento.

a) Genes clase I

Los antígenos de clase I son mediadores de la eliminación alogénica y de la restricción de linfocitos T efectores (17). Se constituyen de un par de cadenas polipeptídicas unidas no covalentemente: una cadena pesada alfa, que es glicoproteica, transmembranal de 45 kilodaltones (kd) y una cadena ligera beta, también glicoproteica, de 12 kd. La cadena alfa es polimórfica y es codificada por el HLA -A, -B ó -C y la cadena beta, monomórfica, es la cadena beta2-microglobulina, codificada por un gen en el cromosoma 15.

La estructura de los antígenos de clase I del SPH, se dedujo inicialmente a partir de la determinación de la secuencia del material purificado de una línea celular humana linfoblastoide (18). Estas moléculas tienen dominios extracelulares, una región transmembranal y una cola citoplásmica corta (figura 2). Se ha podido encontrar además la estructura tridimensional de una molécula clase I, el antígeno HLA-A2 por medio de cristalografía de rayos X (19).

La cadena pesada alfa consta de tres dominios externos (alfa 1, alfa 2 y alfa 3). Los dominios alfa 1 y alfa 2 son los más distales a la membrana celular y son los que contienen los residuos polimórficos. Estos dos dominios conforman el sitio de unión a un antígeno (20), que es de esta forma presentado por la molécula de HLA al receptor del linfocito T.

Koller y colaboradores (1989) construyeron un mapa de los genes clase I, que incluye 6 loci: HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-A, HLA-F(5.4)/HLA-G(6.0) y HLA-9.2p. Abarca en total 11 centimorgans (figura 1).

El gen de la cadena alfa tiene ocho exones: el exón 1 codifica para el líder; el exón 2, para el dominio alfa 1; el exón 3, para el dominio alfa 2; el

exón 4, para el dominio alfa 3; el exón 5, para la región transmembranal y parte de la citoplásmica; los exones 6 y 7, para partes de la región, intracitoplásmica y el exón 8, para el extremo 3', no traducido (18).

La mayor diversidad de aminoácidos de los antígenos de la clase I se halla en diferentes sitios en los dominios alfa 1 y alfa 2, lo que se ha confirmado con experimentos de transfecciones génicas y por medio de reconocimiento con aloanticuerpos (17).

El dominio alfa 3 está muy conservado. El polimorfismo de estas moléculas es mayor que el de las regiones variables de las inmunoglobulinas y la mayoría de las posiciones está en los residuos que van desde el 1 hasta el 194.

En el humano se han detectado por serología alrededor de 23 alelos del locus HLA-A, 49 de HLA-B y se estima que al encontrarse más subtipos de cada alelo, aumentará a 50 para el HLA-A y a más de 100 para el HLA-B (21).

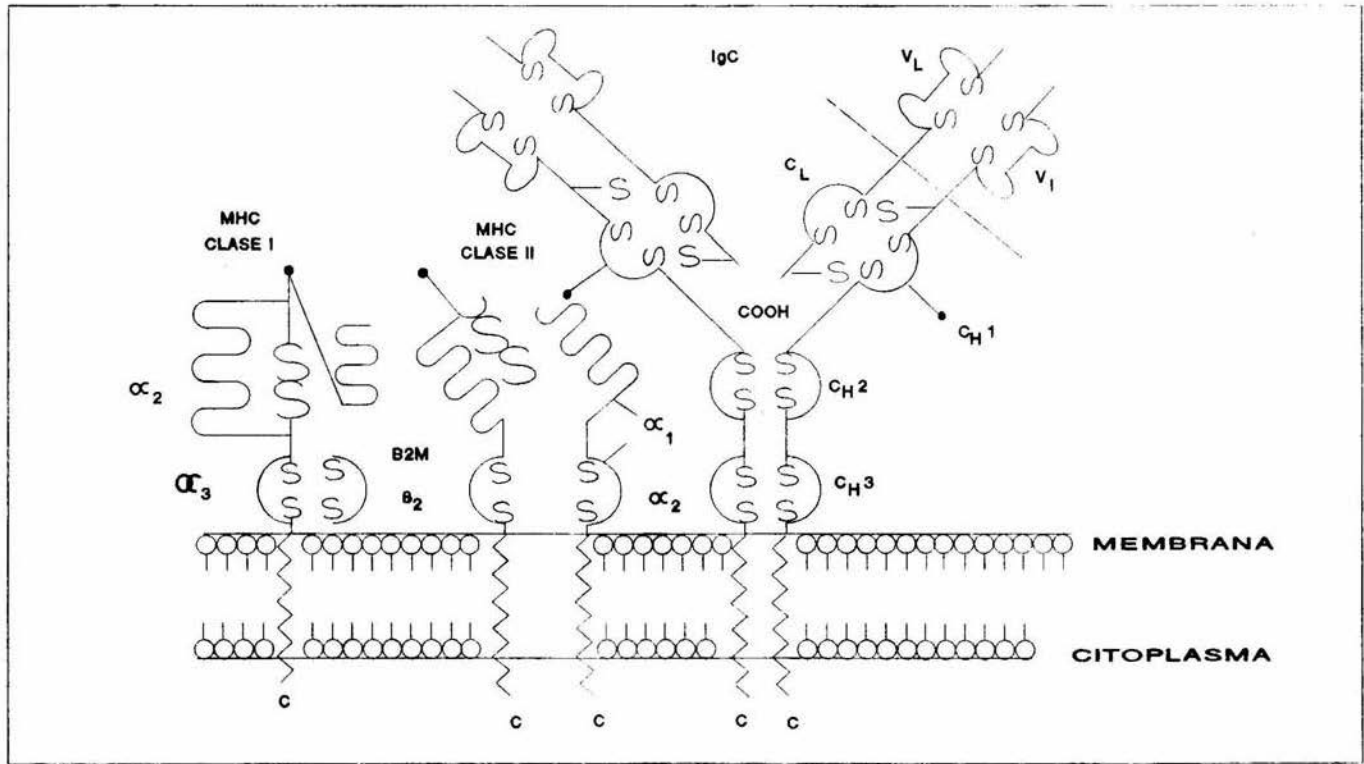


Fig. 2 Moléculas clase I y II del MHC.

b) Genes clase II

Los antígenos de clase II son determinantes en las generación de respuestas proliferativas de linfocitos T en cultivo mixto de linfocitos (18) y pueden presentar antígenos al receptor de linfocitos T. Estas moléculas se encontraron como impurezas en preparaciones de antígenos de clase I. Se constituyen (figura 2) de dos cadenas glicoproteicas unidas no covalentemente, una pesada alfa monomórfica, de 33 kd y una cadena ligera beta polimórfica, de 28 kd (11), ambas codificadas por loci del HLA. Las moléculas de clase II tienen cuatro dominios externos; alfa 1, alfa 2, beta 1 y beta 2: los dominios alfa 1 y beta 1 son polimórficos. Ya se tiene la estructura tridimensional por cristalografía de rayos X, de las moléculas de clase II, (22).

Las moléculas de clase II tienen asociada a la cadenas alfa y beta una glicoproteína transmembranal de 31 kd, conocida como cadena gama o cadena invariante. Esta cadena no se detecta con anticuerpos en la superficie celular, por lo que se piensa que se disocia del complejo entre el paso por el aparato de Golgi y el arribo a la membrana celular (23).

De las cuatro subregiones de las moléculas de clase II (figura 3), la subregión DP consta de dos pares de loci alfa y dos beta, de los cuáles DPalfa2 y DPbeta2 parecen ser pseudogenes (genes que no codifican para proteínas). La subregión DZ/DO se constituye de los genes DZalfa y DZbeta, pero como estos dos loci están separados por varios cientos de kilobases, quizás no formen un dímero alfa/beta (11). La subregión DQ tiene dos genes alfa y dos beta: incluye dos genes DQ y DX (24). La subregión DR tiene cuatro genes beta: el beta1 codifica para las variantes del DR de DR1 al DR18, el beta2 es pseudogen, el beta3 codifica para el

determinante DRw52 y el beta 4 para el determinante DRw53. Hay un gen DRalfa no polimórfico. Se expresan tres tipos de productos de clase II; DP, DQ y DR. No hay evidencias de que DZalfa y DObeta se expresen como proteínas, aunque se ha encontrado ARNm normalmente poliadenilado, de ambos genes, en células B. Pueden formarse pares de cadenas DQalfa y DQbeta en "trans", es decir, la cadena alfa 1 y beta 1 codificadas cada una por uno de los dos cromosomas homólogos de un individuo. También se pueden combinar productos de diferentes loci, como DRalfa y DQbeta, en ratones transgénicos (11).

Los genes de la cadena alfa de clase II tiene cinco exones: el exón 1 codifica para la región 5 no traducida; los exones 2 y 3, para los dominios alfa 1 y alfa 2; el exón 4, para el péptido que conecta una cadena con la otra, la región transmembranal, la cola citoplásmica y parte de la región 3' no traducida; el exón 5 codifica para el resto de esta región (11). Los genes de la cadena beta de clase II tienen seis exones, los primeros 5 análogos a los exones de clase I, con la diferencia de que la cola citoplásmica por los exones 4, 5 y 6.

El polimorfismo de las moléculas de clase II se encuentra en las cadenas beta de los antígenos HLA-DP, -DQ Y DR. Los residuos polimórficos están en cuatro cúmulos en los dominios beta1 de DQ y DR, así como en un cúmulo en alfa1 de DQ. el polimorfismo de la cadena DPbeta es limitado (18).

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 (25).

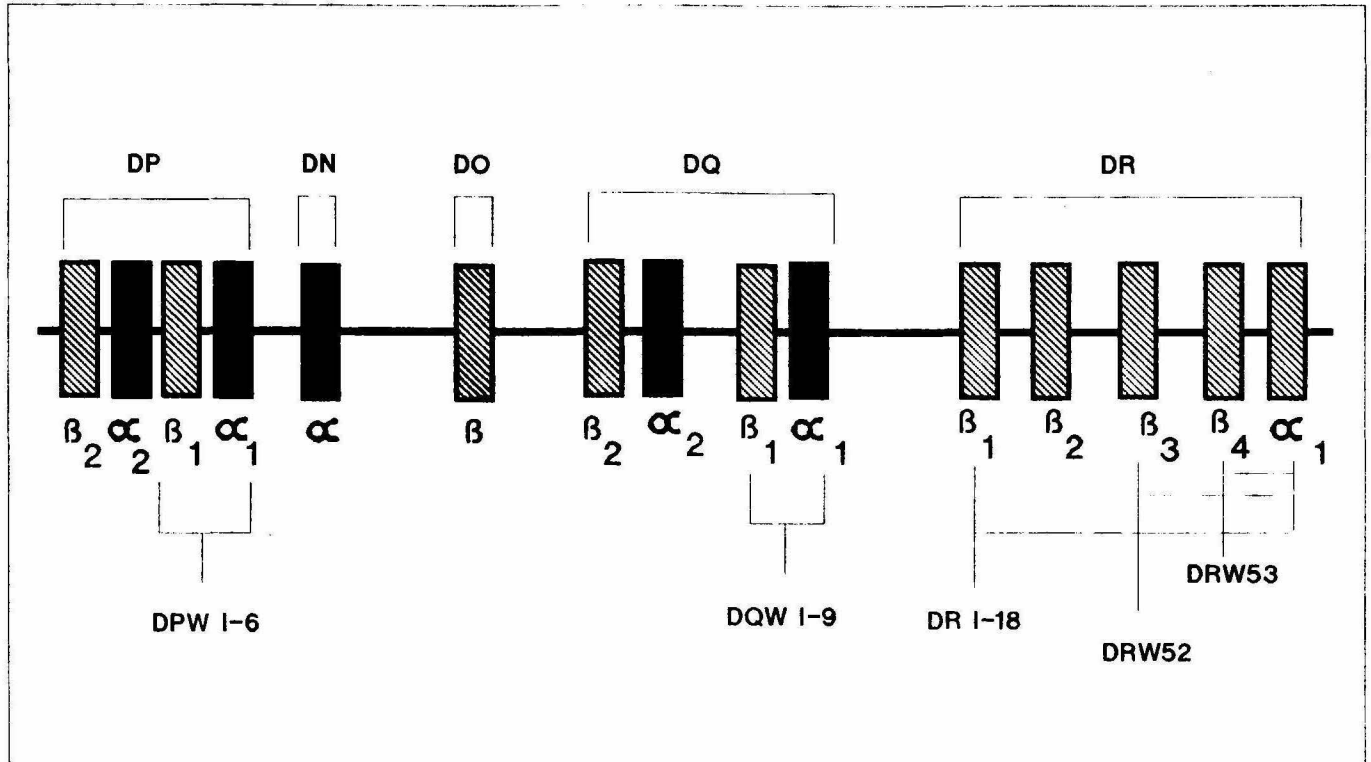


Fig. 3 "SUBREGIONES" DE LA REGION HLA-D

c) Genes clase III

Los genes clase III del SPH, después del HLA, forman el conjunto de marcadores genéticos más polimórfico del humano (26).

Los cuatro loci de esta región (C2, factor B, C4A y C4B), se heredan en bloque, pues al analizar varios centenares de meiosis informativas, se ha observado que no hay intercambios genéticos entre ellos (27,28).

Las moléculas C2 y el factor B son glicoproteínas de una sola cadena de 102,000 y 90,000 Daltones respectivamente y circulan en el plasma en forma de pro-enzimas (29). Se sintetizan en el hígado y en las células de la línea monocito/macrófago.

Ambas moléculas parecen tener tres dominios globulares.

La molécula de C4 (figura 4), pesa 200 kd y tiene tres subunidades unidas por puentes disulfuro: alfa (95kd), beta (75kd) y gamma (30kd). Se sintetiza como una sola cadena en el orden beta-alfa-gamma que luego se glicosila y se procesa intracelularmente: se concreta como una estructura de tres cadenas (30).

La enzima 21-hidroxilasa es un citocromo P-450. Cuando está ausente total o parcialmente provoca un defecto en el metabolismo esteroideo y causa hiperplasia adrenal congénita. Se sintetiza en la glándula suprarrenal.

Se ha podido hacer un mapa molecular de los genes de clase III, gracias al aislamiento de clonas de cósmidos que los contienen y se ha establecido el orden relativo de los loci de C2, fB y C4. Esta región ocupa aproximadamente 120 kb. El orden de los genes, del centrómero al telómero, es 21-OHB, C4B, 21-OH, C4A, fB y C2.

El gen del fB tiene dieciocho exones, caso semejante al del gen de

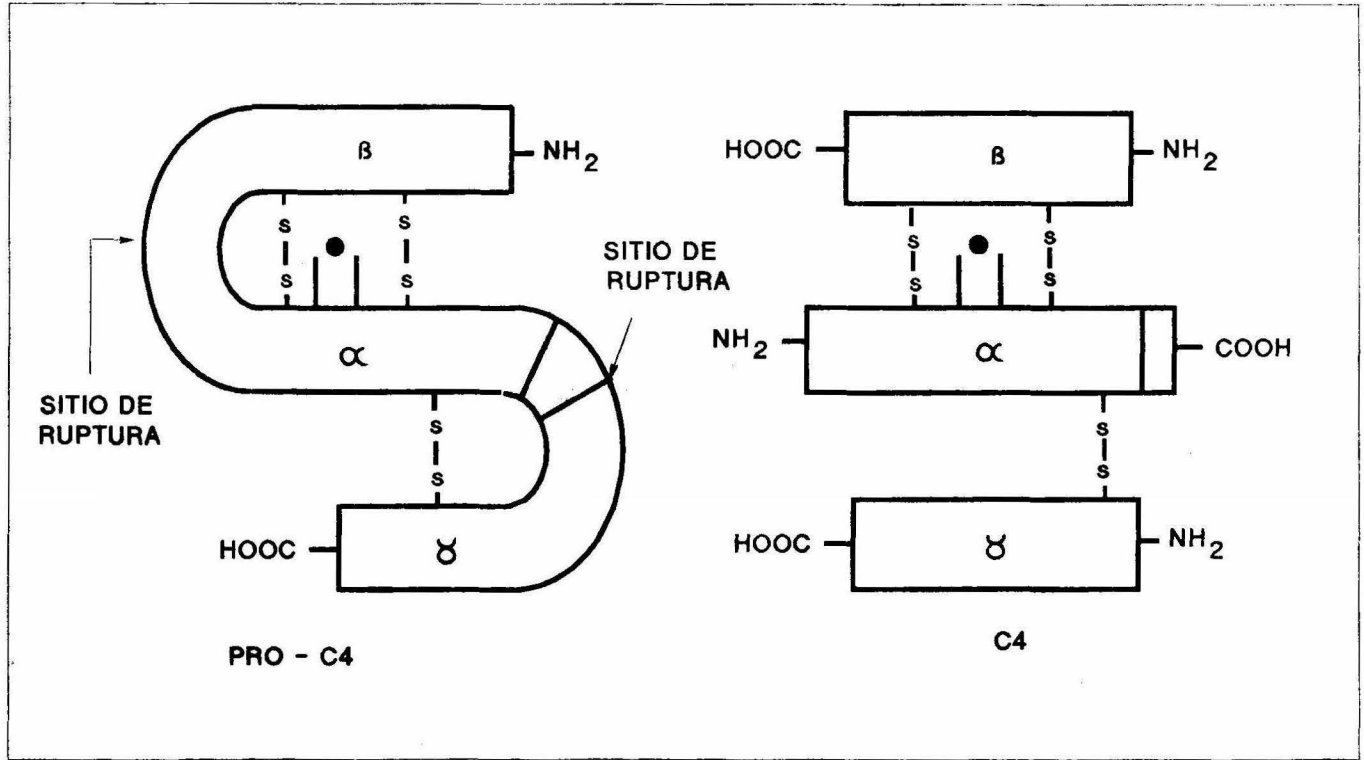


Fig. 4 Estructura de la proteína C4 en el suero humano. En el extremo izquierdo se representa la forma pro C4, la cual dentro de la célula es procesada en forma proteolítica para dar lugar al trímero que se muestra en el extremo derecho.

C2. La organización de los exones de fB revela una relación estructural y evolutiva, a nivel de organización genética, entre esta proteína y otras proteasas de serina (29). Existen dos variantes principales de fB, detectadas por medio de electroforesis de plasma, en gel agarosa, más inmunofijación: F y S. Existen dos variantes menores, F1 y S1 y catorce variantes muy raras (figura 5).

Las variantes de C2 se pueden detectar mediante isoelectroenfoque de plasma o suero y un ensayo hemolítico. Los patrones de C2 constan de dos bandas prominentes de lisis y de dos o tres bandas adicionales ácidas o básicas. La variante común de C2 se llama C, la básica rara es B y la ácida A (figura 6,7).

Hay dos loci para C4 en el humano (28). Producen proteínas similares que difieren serológica, estructural y funcionalmente entre sí.

Los antígenos del grupo sanguíneo Chido y Rodgers se encuentran en los productos de los genes de C4B y C4A respectivamente. El polimorfismo estructural de C4 es mayor que el de C2 o fB y es el que proporciona el polimorfismo de los genotipos (30). 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 "QO" si el alelo es nulo (28). Figura 7 (pag.21).

Existen alelos nulos de C4A y C4B. Alrededor de la mitad resultan de pérdidas de ADN que incluyen a C4A y 21-OH o a C4B y 21-OHA o a C4B y 21-OHB, no se ha visto pérdida de C4A y 21-OH. Los alelos nulos que no se deben a pérdidas de ADN probablemente resultan de varios defectos en la transcripción o la traducción (30).

Los dos loci de la 21-hidroxilasa, 21OHA Y 21-OHB, se encuentran en dirección 3', junto a los loci de C4A y C4B, respectivamente (31,32).

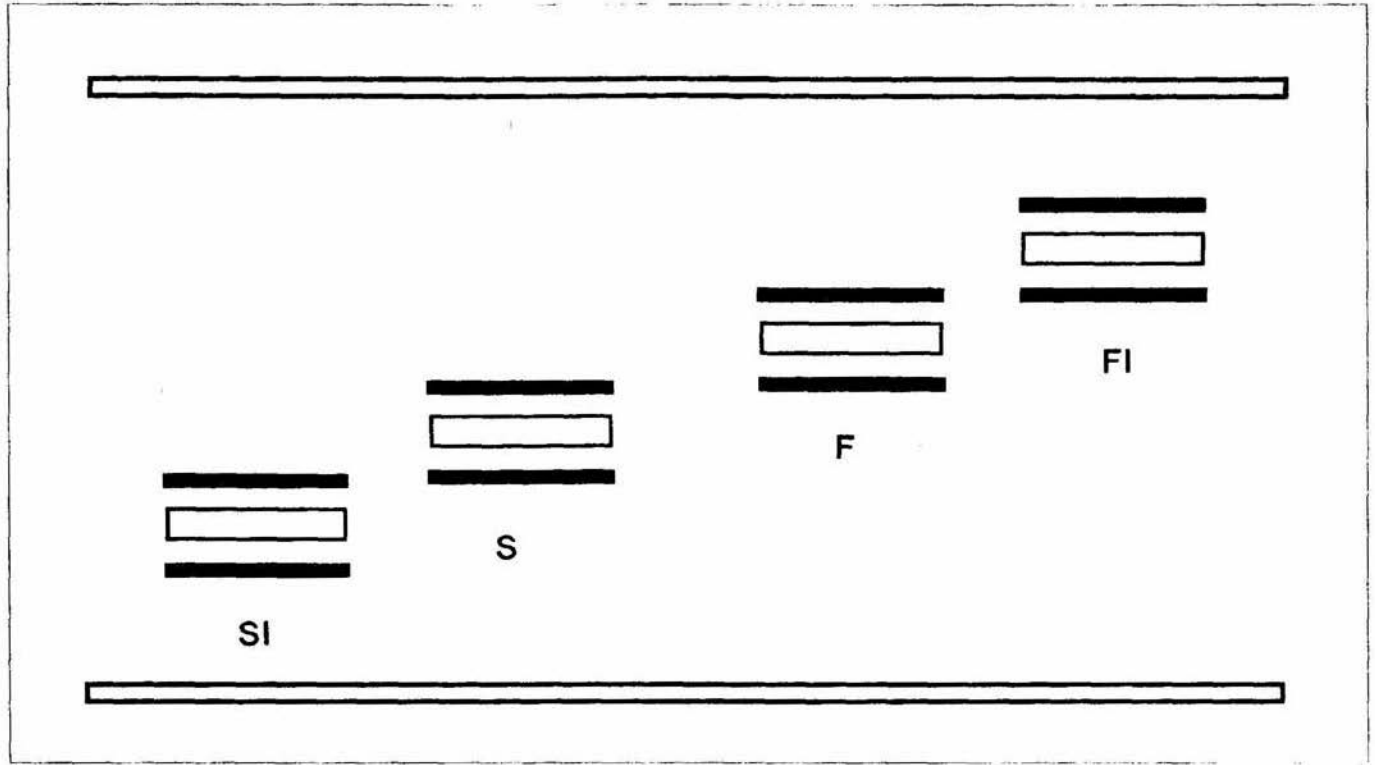


Fig. 5 Variantes electroforéticas del factor B.

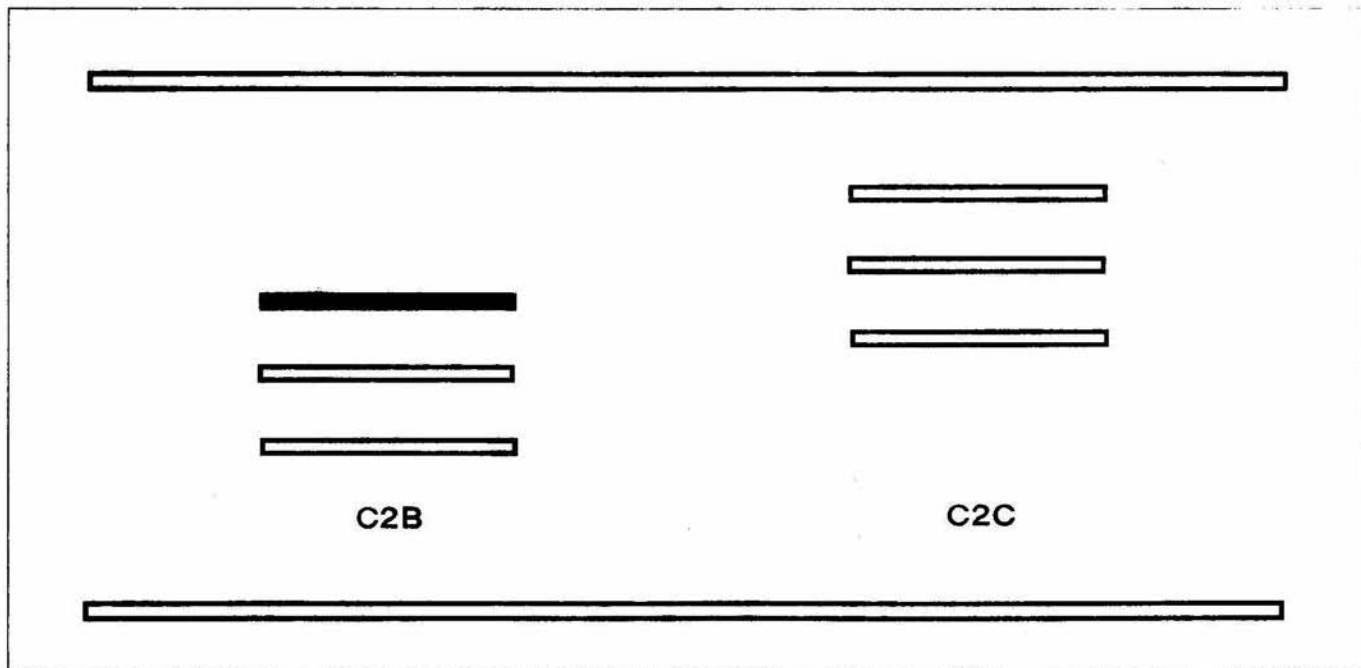


Fig. 6 Variantes electroforéticas de C2.

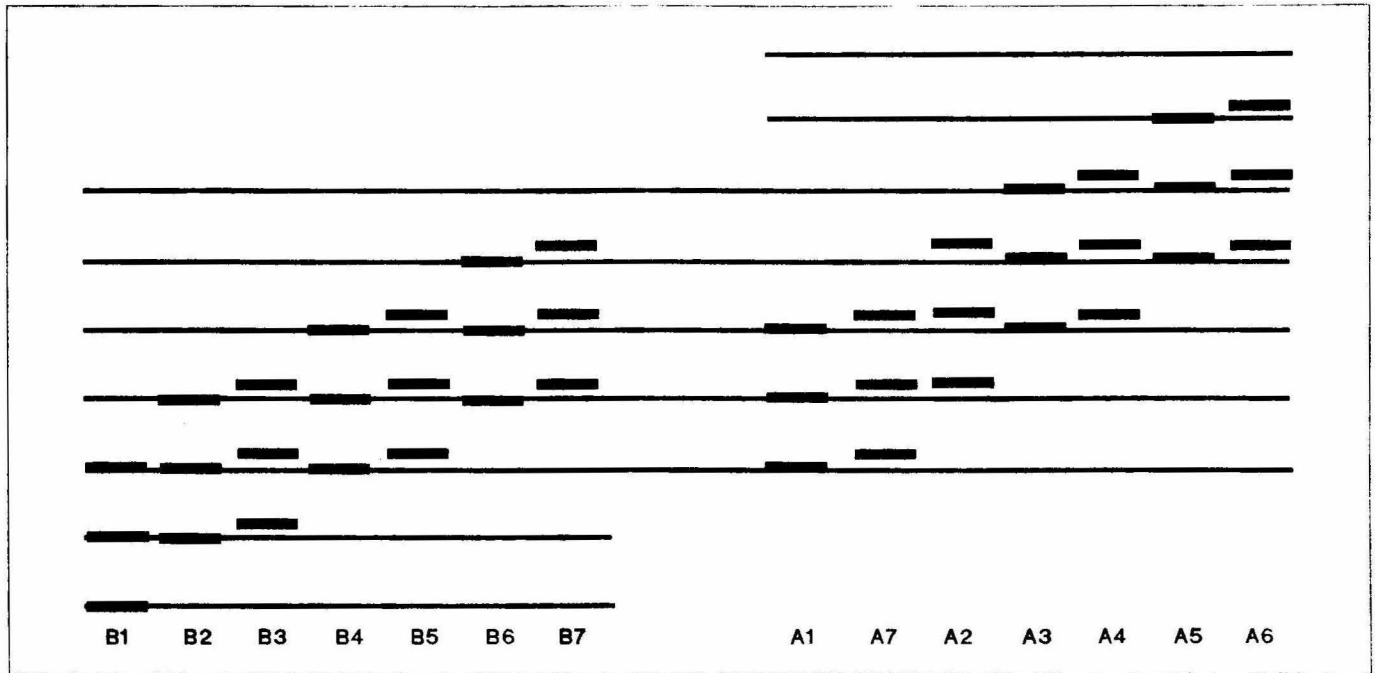


Fig. 7 Variantes electroforéticas del cuarto componente del complemento.

Se ha sugerido que los genes de la 21-hidroxalasa se duplicaron junto con los dos genes de C4.

Sólo el locus 21-OHB es importante para la biogénesis de esteroides (31).

d).-Desequilibrio de Unión y haplotipos extendidos

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 dos o más loci que se encuentran juntos con mayor frecuencia 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(32). Esta es una característica del sistema de HLA en todas las poblaciones estudiadas y es el fenómeno generalmente responsable de los haplotipos más frecuentes.

Como el desequilibrio de unión entre los loci del HLA se extiende a otros genes de la región, se forman haplotipos que incluyen entonces a los genes clase I, II y III y al gen de la glioxalasa I. Se pueden observar tales grupos de ligamiento extendido al analizar haplotipos completos de SPH (32). Por ejemplo en los individuos de raza blanca, el haplotipo HLA-A1, B8, SCO1, DR3, DQ2 se asocia con la diabetes insulínica, la tiroiditis autoinmune, el lupus eritematoso generalizado, la hepatitis crónica activa y algunas formas de glomerulonefritis primaria. Otro haplotipo es el HLA-A2, B7, SC31, DR2, DQ1 que se asocia con esclerosis múltiple; otro más es el HLA-A2, B44, FC31, DR7, DQ2 que se asocia con enfermedad celiaca.

CAPITULO IV

HIPOTESIS

ATAKIA TELANGIECTASIA

IV. HIPOTESIS

Existe un haplotipo extendido autóctono asociado con Ataxia telangiectasia en pacientes mexicanos.

CAPITULO V

OBJETIVOS

ATAXIA TELANGIECTASIA

V. OBJETIVOS

- 1.- Tipificar la expresión de los genes Clase I, Clase II y Clase III del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) en pacientes y familiares con Ataxia telangiectasia de origen mexicano.
- 2.- Comparar estos resultados con los haplotipos encontrados en 10 familias mestizas definidas como poseedoras de haplotipos extendidos autóctonos.
- 3.- En caso de no encontrar un haplotipo extendido autóctono en las familias mexicanas con AT buscar la presencia de haplotipos extendidos de otro origen como son caucásicos y japoneses.

CAPITULO VI

MATERIAL Y METODOS

VI.1 Muestra.

VI.2 Tipificación de las moléculas clase I y II.

VI.3 Tipificación de las moléculas clase III.

a) Factor B.

b) Cuarto componente del complemento.

c) Segundo componente del complemento.

VI.4 Análisis Estadístico.

VI. MATERIAL Y METODOS

VI.1 MUESTRA

El estudio incluye a 4 familias (personas emparentadas en primer grado: padres, hermanos. Residentes en la República Mexicana con una generación nacida en México según la información proporcionada por los familiares.

VI.2 TIPIFICACION DE LAS MOLECULAS DE CLASE I Y DE CLASE II

❖ MATERIALES Y EQUIPO

Jeringas estériles
Agujas estériles
Pipetas Pasteur
Jeringa Hamilton de disparo constante (1 ml)
Jeringa múltiple Hamilton de disparo constante (5 ml)
Jeringa múltiple Hamilton de disparo constante (1 ml)
tubos falcon de 50 ml
Tubos de vidrio, 13x100 ml
Tubos fisher
Cajas Petri
Cámara de Neubauer
Balanza analítica
Microplacas para microlinfocitotoxicidad, Nunc
Vortex
Centrifuga refrigerada CU-5000 Damon/JEC Devison
Centrifuga Fisher
Microscopio Invertido de Contraste de fases (Zeiss)
Microscopio óptico
Negatoscopio

✧ REACTIVOS

1.-Heparina.

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

2.-Medio RPMI 1640.

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

3.-Ficoll-Hypaque.

Ficoll 9% en agua destilada 12 partes. Hypaque 34% en agua destilada 5 partes (Winthrop). La densidad de la mezcla deberá ser de 1.076-1078.

4.- La solución amortiguadora salina de fosfatos (PBS).

NaCL	15.3 g.
Na₂HPO₄	7.6 g.
KH₂PO₄	0.25g.

Agua destilada hasta 2 lts.

Llevar hasta pH 7.4 con HCL 6N.

5.- Complemento.

Obtenido comercialmente de Pel-Freez. (N. Deerbrook Tr. Brown Deer. WI)

6.- Fibra de Nylon-Lana.

Se utiliza Nylon de Travenol laboratorios, si no se cuenta con este material se emplea fibra de nylon "celanese" y se trata de la siguiente forma:

- 1.- Se lava la fibra con HCL 1N 3 veces.
- 2.- Se elimina el HCl con agua destilada.
- 3.- Se lava 3 veces con NaOH 1N.
- 4.- Se lava el exceso de álcali con agua destilada.
- 5.- Se confirma el pH hasta que el último lavado sea igual al del agua.
- 6.- Se pone a secar extendida en la estufa a 37°C.

Preparación de la columna.

- 1.- En una caja petri se peina 0.3 gr. de nylon-lana con pinzas o pipeta pasteur.
- 2.- El nylon-lana se empaca cuidadosamente en una jeringa de 10ml.

❖ **MATERIAL BIOLÓGICO**

- 1.- Veinte ml de sangre venosa heparinizada.
- 2.- Eritrocitos de carnero al 4% en PBS.
- 3.- Antisuero de diferentes especificidades anti-

HLA obtenidos de diferentes fuentes (C. Six. N. Grandville Road, Mequon, WI y Pel-Freez N. Deerbrook Deer. WI.).

❖ **TECNICAS**

a).-Separación de linfocitos por gradiente de Ficoll-Hypaque.

- 1.- Se toman 20 ml. de sangre venosa heparinizada.
- 2.- Se diluye la sangre con un volumen igual de PBS pH 7.4.
- 3.- Se colocan 15 ml de ficoll hypaque en un tubo de 50 ml de marca falcon y se le agrega la dilución de la sangre y el PBS cuidadosamente por las paredes del tubo.
- 4.- Se centrifuga a 2500 rpm (con un rotor de 10 cm de diámetro) 20 minutos a temperatura ambiente.
- 5.- Se aspira con pipeta pasteur la interfase formada por la capa de mononucleares y se pasa a otro tubo.
- 6.- El paquete de mononucleares se diluye en PBS y se centrifuga a 1000 rpm durante 10 minutos para eliminar las plaquetas.
- 7.- Se descarta el sobrenadante y el paquete se resuspende en PBS y se centrifuga a 1000 rpm 10 minutos.
- 8.- Se repite el paso 7.

- 9.- Se descarta el sobrenadante y el paquete se resuspende para ajustar a 5×10^6 cel/ml.
- 10.- Estos linfocitos se pueden utilizar para la tipificación de moléculas clase I.

b).-Purificación de linfocitos T y B.

Para la purificación de linfocitos T y B se utilizan tres técnicas diferentes, las tres técnicas con inmunofluorecencia para probar pureza de linfocitos B.

^ TECNICA DE NYLON-LANA

1. Los linfocitos previamente purificados y resuspendidos en 2 ml. de RPMI+10% suero bovino fetal (SBF) se colocan en la columna de nylon a la que previamente se ha lavado con 5 ml de RPMI y se ha activado con 10 ml de RPMI+10% SBF durante 30 minutos, hasta que todo el líquido penetre en el nylon. Inmediatamente después se coloca la columna en posición horizontal.
2. Se incuba horizontalmente 45 minutos a 37°C.
3. Se coloca la columna sobre un tubo marcado pra los linfocitos T y se deja escurrir el contenido.
4. Se le agregan por la jeringa 30 ml de

RPMI+10% SBF.

5. Se coloca la columna sobre un tubo marcado para los linfocitos B y se agregan 30 ml de RPM+SBF 10% frío.
6. Se centrifugan las células T y B a 1500 rpm durante 10 minutos y se ajustan a 5×10^6 céls/ml.

NOTA: Al comenzar la separación se debe incubar el RPMI a 4°C y a 37°C para que al momento de usarlo tenga la temperatura deseada.

▲ SEPARACION DE CELULAS B POR LIMPHO-KWIK

Técnica Comercial.

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

1. Obtener de 5 a 20 millones de linfocitos totales a partir de ficoll-hypaque.
2. Pasar el botón de linfocitos a un tubo de 1 ml marca fisher y centrifugarlo a 1000 g por minuto.
3. Añadir 0.8 ml. de reactivo 1 (un anticuerpo monoclonal dirigido contra antígenos particulares de células T) y mezclar bien.
4. Incubar a 37°C por 1 hora en baño maría o incubador y mezclarlo ocasionalmente.
5. Terminada la incubación adicionar 0.22 ml de

RPMI+SBF 10% y centrifugar 2 minutos a 2000 g.

6. Descartar el sobrenadante y agregar 0.5 ml. de reactivo 2 (fuente de complemento) mezclar bien.
7. Centrifugar a 2000 g. dos minutos.
8. Retirar el sobrenadante y lavar los linfocitos dos veces con RPMI+10% SBF, centrifugarlo a 1000 g un minuto.
9. Resuspender con 1 ml de medio el botón celular y observar la viabilidad. En caso de presentar células muertas remover con DNAsa o gradiente de ficoll-hypaque.

RECOMENDACIONES: Estos reactivos son útiles para purificar los linfocitos B de pacientes diabéticos, de cáncer no leucémico y donadores cadavéricos. su uso no se recomienda en células congeladas y muestras de más de dos días.

▲ SEPARACION DE CELULAS T Y B MEDIANTE LA FORMACION DE ROSETAS.

1. Se utilizan los glóbulos rojos de carnero (GRC) de máximo 2 semanas de almacenamiento en solución de Alserver's, lavado tres veces con PBS y ajustados al 4% con solución salina.

2. Los linfocitos ya purificados por ficoll-hypaque y resuspendidos en RPMI+10% SBF a una concentración de 5×10^6 céls/ml son colocadas en cajas petri e incubados a 37°C durante una hora (para eliminar los macrófagos).
3. Posterior a la incubación, con pipeta pasteur se recolecta el medio con células y se enjuaga la caja con RPMI y se recolecta en el mismo tubo.
4. Se centrifugan las células y se concentran a 10×10^6 céls/ml en RPMI+10% SBF.
5. Se le agrega la mitad de su volumen en SBF.
6. Se agrega GRC en igual proporción que las del volumen inicial de la concentración de células.
7. Se centrifuga en frío a 1200 rpm durante 10 minutos.
8. Se incuba a 4°C durante 12 a 18 horas.
9. Se mezcla suavemente la suspensión y se deposita un gradiente de ficoll hypaque (todo a 4°C).
10. Se centrifuga a 2000 rpm 20 minutos.
11. Se saca el anillo de células B.
12. Se lava con PBS a 1500 rpm durante 15 minutos.
13. El botón se resuspende en PBS y se centrifuga 2 veces a 1000 rpm 10 minutos.

^ ENSAYO DE MICROLINFOCITOTOXICIDAD PARA TIPIFICACION DE ANTIGENOS.

CLASE I Y II (33,34).

1. En cada uno de los pozos de las cajas con antisueros se coloca 1 ml. de la suspensión de células T o B según se vaya a estudiar los genes clase I ó clase II respectivamente.
2. Las cajas con antisueros para clase I se incuban durante 30 minutos y las microplacas para la clase II 60 minutos.
3. Se agregan 5 µl del complemento de conejo correspondiente pra cada molécula (I y II) a cada pozo.
4. Las microplacas pra las moléculas clase I se incuban durante una hora y las Clase II se incuban 2 horas.
5. Se agregan 2 µl de formalina (formaldehido al 40% + 0.3g Na₂HPO₄+0.1g NaH₂PO₄) y 3 µl de eosina.
6. Se lee en microscopio invertido, se cuenta el número de células vivas y muertas y los resultados se informan de acuerdo con la siguiente relación:

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

VI. 3 TIPIFICACION DE LAS MOLECULAS CLASE III

a).-Factor B (FB) de la vía alterna del complemento

El polimorfismo del factor B se determina mediante la técnica de electroforesis de alto voltaje en gel de agarosa e inmunofijación de las bandas de proteínas mediante anticuerpo específico (32,35).

✧ EQUIPO

1. Cámara para electroforesis Gelman Science.
2. Fuente de poder Deluxe Gelman Science.
3. Bomba de agua circulante Thomas Scientific.
4. Centrifuga CU-5000 Damon/JEC División.
5. Balanza analítica Sartorius.
6. Agitador magnético con platina de calentamiento.

✧ MATERIAL

1. Rectángulo de película de plástico de 10 x 20 cms (Gel Bond Marine Callods. Maine USA).
2. Placas de vidrio de 10 x 20 cms.
3. Marcos de plástico en forma de "U" de 1 mm de espesor.
4. Papel filtro tipo Whatman No. 1.
5. Aplicador de muestras.

6. Micropipetas de 15 y 25 ml.

7. Sujetadores.

✧ **REACTIVOS**

1. Amortiguador de barbital y lactato de calcio 0.05 M pH 8.6.
2. Agarosa Sea-Kem Maine USA al 1% en amortiguador de barbital.
3. Solución salina al 9.85%
4. Glicerol.
5. Solución de azul de Coomassie al 2.5% (en una solución de 45% metanol, 10% ácido acético en agua).
6. Solución decolorante (metanol al 50% en agua destilada más la quinta parte del volumen total de ácido acético).

✧ **MATERIAL BIOLÓGICO**

1. Plasma obtenido con EDTA de 5 ml. de sangre.
2. Alicuota de hemoglobina humana normal.
3. Anticuerpos anti-factor B. Atlantic Antibodies. (Scarborough, Mo USA).

✧ **TECNICA**

1. Preparación del Gel.

Cubrir la placa de vidrio mediante una brocha con una capa de glicerol, inmediatamente colocar la película de plástico y presionar para sacar las burbujas de aire. Posteriormente colocar el marco de plástico en forma de "U" el cual se fija a la placa mediante los sujetadores, una vez lista la cámara se vacía la solución de agarosa caliente y se deja solidificar. Ya que se solidifica el gel, se quitan los sujetadores y el marco de plástico, se seca con papel filtro la zona donde se aplicarán las muestras.

2. Aplicación de las muestras

Con papel filtro Whatman No. 1 se seca aproximadamente 3 cm. del final del gel (a través de todo el gel) donde se aplican las muestras (Cátodo). Repetir el proceso dos veces. Sobre el área seca se coloca un aplicador de plástico que tiene perforaciones rectangulares para aplicar las muestras (MASK). En la primera perforación se colocan aproximadamente 10 µl de hemoglobina A que sirve como indicador visual y en las demás se coloca el mismo volumen de cada muestra. Se espera hasta que las muestras se hayan absorbido en el gel (aproximadamente 15 min.) Se quita el exceso de muestra que no penetró con papel Whatman No. 1 y se retira el aplicador de plástico.

3. Corrimiento de las muestras

Las placas se colocan sobre las bases enfriadas por agua circulante entre 6 y 10°C para evitar el sobrecalentamiento de la agarosa. El contacto entre el gel y el amortiguador electrodo se realiza mediante una mecha

constituida por 4 hojas de papel filtro Whatman No. 1 (del mismo ancho que la placa del gel) perfectamente humedecida en el amortiguador. Una de las puntas de la mecha se coloca atrás de las muestras y la otra a 1 cm final del gel entre las dos mechas debe haber una distancia de 6.5 cm.

La superficie del gel se cubre con un vidrio para prevenir desecamiento y la electroforesis se lleva a cabo a 350 V (75 mA) hasta que la hemoglobina haya migrado hasta la segunda mecha (alrededor de 3 horas).

4. Inmunoprecipitación

Las bandas del factor B migran en una zona de 3 a 3.5 cm del origen. En esta zona debe aplicarse el antisuero específico anti-fB humano.

Se incuba el gel durante 1-2 hrs. a temperatura ambiente en una cámara húmeda horizontal.

Se enjuaga posteriormente el gel con agua destilada y se cubre completamente la superficie con papel Whatman, el cual ha sido humedecido con agua destilada. Esto se cubre ahora con aproximadamente 12 hojas de papel secante tipo toalla. Se coloca encima una placa de vidrio y un peso de aproximadamente 4 kilogramos.

Se remueve después de 10 min. y se quita el peso y el papel. Posteriormente el gel se enjuaga durante toda la noche en un litro de solución salina para remover los restos de proteínas inespecíficas.

Enseguida, el gel se lava en agua destilada durante 20 min, se seca al aire o aplicando calor.

Se tiñe la placa con azul de coomasie durante 10 min.

Se destiñe la placa con la solución decolorante hasta obtener el mejor contraste.

Se deja secar el exceso de metanol a temperatura ambiente.

Se lee la placa. Las variantes electroforéticas obtenidas se muestran en la figura 5.

b) TIPIFICACION DEL FACTOR C4 DEL SISTEMA DEL COMPLEMENTO

El cuarto componente del complemento C4 es codificado por dos loci cercanamente unidos entre sí y localizados entre los loci HLA-B y HLA-D en el brazo corto del cromosoma 6 humano. La electroforesis seguida de inmunoprecipitación y tinción de muestras de plasma, previamente tratadas con neuraminidasa de Clostridium perfringens, para eliminar el ácido siálico, revela que ambos loci de C4(C4 y C4B) son altamente polimórficos.

◆ TECNICA

1. Desialización

Diez µl de la muestra se mezclan con 2 µl de neuraminidasa y se colocan en un sistema de dialisis continua durante 18 horas a 4°C.

2. Preparación del gel

Se cubre una placa de vidrio de 26 cm x 12.5 cm con una solución de agarosa al 0.5% en agua destilada, se deja secar.

Se forma un molde colocando encima de la placa anterior una segunda placa de plástico siliconizado de 1 mm de espesor, se mantienen juntas las placas mediante sujetadores metálicos.

Se prepara una solución de agarosa al 0.75% en una mezcla de 60 ml. de agua desionizada, 35 ml de buffer para C4 y 5 ml de EDTA 0.2 M.

Se vierte la solución de agarosa de corrimiento para C4 aún caliente dentro del molde y se deja solidificar, se sella perfectamente el molde con envoltura de plástico y se almacena en refrigeración hasta su uso.

Se enjuaga el gel en una solución salina durante toda la noche y posteriormente se lava con agua corriente durante 20 min.

Se seca el gel y se tiñe con una solución de azul de coomassie. Las bandas obtenidas se observan en la figura 7.

c) TIPIFICACION DEL FACTOR C2 DEL SISTEMA DEL COMPLEMENTO.

El polimorfismo del segundo componente del complemento puede ser detectado después de isoelectroenfoque de muestras de plasma o suero en un gel de acrilamida seguido por la aplicación de un recubrimiento hemolítico funcional. La lisis del complemento ocurre en el sitio que contiene eritrocitos de carnero sensibilizados y todos los componentes del complemento, excepto C2, esa será la posición de la proteína (8).

Las bandas polimórficas de éste componente del complemento son mostradas en la figura 6.

◇ *TECNICA*

1. Preparación de la solución de eritrocitos de carnero sensibilizados.

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

Se lavan 4 veces con solución de Veronal salino con EDTA 0.01 M a 2000 rpm durante 10 min.

Se lavan 4 veces a 2000 rpm durante 10 minutos con solución de GVB (agarosa-VBS).

En una celda de espectrofotómetro se adionan 0.1 ml. de la suspensión celular y de 2.4 ml. de agua destilada.

Se ajusta a cero con un blanco de agua destilada.

Se lee la concentración de hemoglobina a una longitud de onda de 541 nm.

Cuando la absorción es de 0.420, la concentración celular es de 1×10^6 células/ml. El rango de aceptación para la concentración es de 0.40-0.43 nm para llegar a la concentración requerida se utiliza la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{LECTURA OBTENIDA} \times \text{VOLUMEN DE LA SUSPENSION CELULAR}}{0.420} = \text{VOLUMEN AL QUE SE DEBE LLEVAR}$$

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

2. Preparación del gel

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

Encima de éste último se coloca una placa de plástico siliconizado de las mismas dimensiones del vidrio. Se mantienen las placas juntas con sujetadores metálicos, de tal forma que se obtiene una cámara de 1 mm de espesor, con un extremo abierto.

Para hacer el gel se combina solución stock de acrilamida 26.5 ml,

anfolina 1.5 ml, y solución de riboflavina 7ml.

Se vacía la mezcla con ayuda de una pipeta de boca ancha y se deja polimerizar el gel bajo una lámpara de luz fluorescente durante una hora.

Se enfoca el gel durante 18 horas, o hasta que la corriente haya caído a 2 mA/gel.

3. Ensayo hemolítico funcional

Después del electroenfoque, se enjuaga el gel en una solución de yoduros durante 30 min. a temperatura ambiente.

Se vacía la solución de yoduro y se enjuaga el gel en la solución de VBS-Ca, Mg.

Después de enjuagar la placa con el gel, se coloca un marco de 2mm de espesor y un vidrio de 20.5 cm x 15 cm y se fija con sujetadores.

Se hace la siguiente mezcla y se vacía en la cámara anterior.

Solución de VBS Ca Mg 7.5 ml, agarosa al 2% 7.5, solución de eritrocitos y se lava en una solución que contiene 300 ml de PBS y 3 ml de glutaraldehído. Se enjuaga durante 30 min. Se deja secar a temperatura ambiente. Los patrones obtenidos se muestran en la figura 5.

VI.4 ANALISIS ESTADISTICO

El diseño del estudio es transversal (es decir la tipificación del HLA clase I, II y III es única), prospectivo (la lectura o recopilación de los datos o variables se hizo prospectivamente), observacional (se observó la estructura genética en el sistema HLA, no se introduce ninguna maniobra experimental) y analítico/descriptivo (se busca asociación o relación de causalidad entre herencia y patología y describe los haplotipos que luego se analizan), comparativo porque contrastan en una misma familia, afectados, portadores y sanos (en relación a haplotipo) y los pacientes con la población general.

Para el análisis estadístico se usaron las pruebas de chi cuadrada (X^2) y la prueba efectuada por Fisher (14).

La comparación entre los dos grupos de estudio de dos características independientes se efectúa generalmente mediante tablas de contingencia de 2 x 2.

Para poder establecer la probabilidad que ambos grupos difieran uno del otro en forma significativa, y que su variación no haya sido solo debida al azar, la tabla de 2 x 2 se evalúa mediante la prueba estadística de X^2 .

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

Si el valor obtenido de la prueba de X^2 implica un valor de "p"

menor a 0.05, la hipótesis nula que dio lugar a la comparación se rechaza. Un valor de $p < 0.05$ significa que en menos de 1 en 20 casos se cometen errores al rechazar la hipótesis nula.

El valor de "p" se obtiene al interpolar en tablas de distribución X^2 el valor numérico de X^2 en función de los grados de libertad.

Si las cifras esperadas en a, b, c ó d fueran menores a 5, la prueba de X^2 deja de tener validez y se debe utilizar en éste caso la prueba exacta de Fisher que nos da directamente el valor de "p".

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

El valor de p fue corregido utilizando la fórmula de Yates que le da más fuerza a la comparación.

$$\frac{[(ad - cb) - 0.5]^2 N}{abcd}$$

Se calculó el riesgo relativo (RR) para cada antígeno estudiado.

$$RR = \frac{ac}{bd}$$

CAPITULO VII

RESULTADOS

ATAXIA TELANGIECTASIA

VII. RESULTADOS

Los árboles genealógicos de las familias incluidas en este estudio se muestran en la figuras (8,9,10 y 11) y los resultados en las tablas de la 1 a la 8.

El estudio a nivel de la proteína mostró que los pacientes con AT tienen una delección del gen C4A y que dicha delección no es parte de ningún haplotipo extendido autóctono mexicano.

Al comparar los haplotipos que contienen la delección con haplotipos extendidos caucásicos que se sabe contienen la deficiencia de Iga en éste grupo étnico se pudo observar que el origen de los haplotipos con At no tiene su origen en este grupo étnico (caucásicos) por lo que su presencia no puede explicarse por mestizaje.

Al comparar con haplotipos extendidos japoneses se vio que tampoco tienen este origen.

Puede notarse que cada familia aporta de 3 a 4 haplotipos cada una, dos heredados por el paciente y dos que aunque presentes en la familia no fueron heredados por el enfermo. En cada uno de los árboles genealógicos, los haplotipos señalados como "c" y "d" corresponden a los de la madre y a los presentes en el paciente se le asignan las letras a/c.

En esos mismos familiogramas se siguen los elementos de notación genética internacional, por lo que los cuadrados simbolizan al padre, los círculos a la madre y el caso índice o propósito está señalado por la flecha.

Los antígenos del Sistema Principal de Histocompatibilidad segregaron siguiendo las leyes de herencia mendeliana para alelos codominantes, por lo que todos los antígenos presentes en los padres fueron segregados a la descendencia.

Están señalados los genes del sistema HLA-B, HLA-C, HLA-DR, HLA-DQ, y los genes de los complotipos (FB, C2, C4A, C4B), así por ejemplo el complotipo SC31 denota el alelo "S" del factor B, el alelo "C" del C2, el alelo 3 del gen C4A y el alelo 1 del gen C4B.

La tabla 1 muestra todos los haplotipos presentes en las familias con Ataxia telangiectasia, la cual fue posteriormente dividida entre los haplotipos presentes solo en los pacientes (tabla 2), los presentes en los familiares (tabla 3), para que posteriormente fuesen comparadas las frecuencias génicas de cada uno de los componentes del Sistema Principal de Histocompatibilidad (clases I, II y III) con las presentes en un grupo de controles mestizos mexicanos, los cuales se muestran en la tabla 4. Cada uno de los grupos (pacientes, familiares y controles) fueron comparados entre sí; la tabla 5 muestra que no hay diferencias significativas en cuanto a los antígenos del sistema HLA-A, prácticamente tampoco las hay en cuanto a los genes del sistema HLA-B (tabla 6), con excepción de la ausencia del HLA-B8 en los familiares. La tabla 7 muestra las comparaciones a los genes del HLA-DR y HLA-DQ que muestran un aumento en pacientes vs controles del HLA-DR7 y DQ2, así como también una disminución del HLA-DR4 en pacientes vs controles. Finalmente la tabla 8 muestra los datos más significativos, donde encontramos un incremento en pacientes vs familiares y vs controles, del alelo nulo del gen C4A (C4A*Q0) ($p=0.01$) y del complotipo SC01 ($p=0.004$ y $p=0.002$) en pacientes vs familiares y controles respectivamente.

CAPITULO VIII

DISCUSSION

ATAXIA TELANGIECTASIA

VIII. DISCUSION

Por lo anterior puede inferirse que la no expresión del gen C4A actúa de manera aislada como marcador de la deficiencia de IgA en pacientes mexicanos con AT. La falta de expresión de los genes C4A y de la IgA pudiera ser debida a defectos transcripcionales.

Dicho defecto puede ser particular a cada grupo étnico por lo que es de esperarse que los pacientes con AT en diversas partes del mundo tengan diferentes haplotipos de MHC.

Los alelos nulos del gen C4A se han asociado a otras enfermedades con trastornos inmunológicos como es el caso de Lupus Eritrematoso Generalizado, y de la misma manera se sabe que individuos con inmunodeficiencias tienen cierta proclividad al desarrollo de enfermedades autoinmunes igual que ocurre en sus familiares en primer grado, lo que apoya una relación directa entre inmunodeficiencia y autoinmunidad que pudiera estar marcada por la presencia de los alelos nulos en los Loci del gen C4.

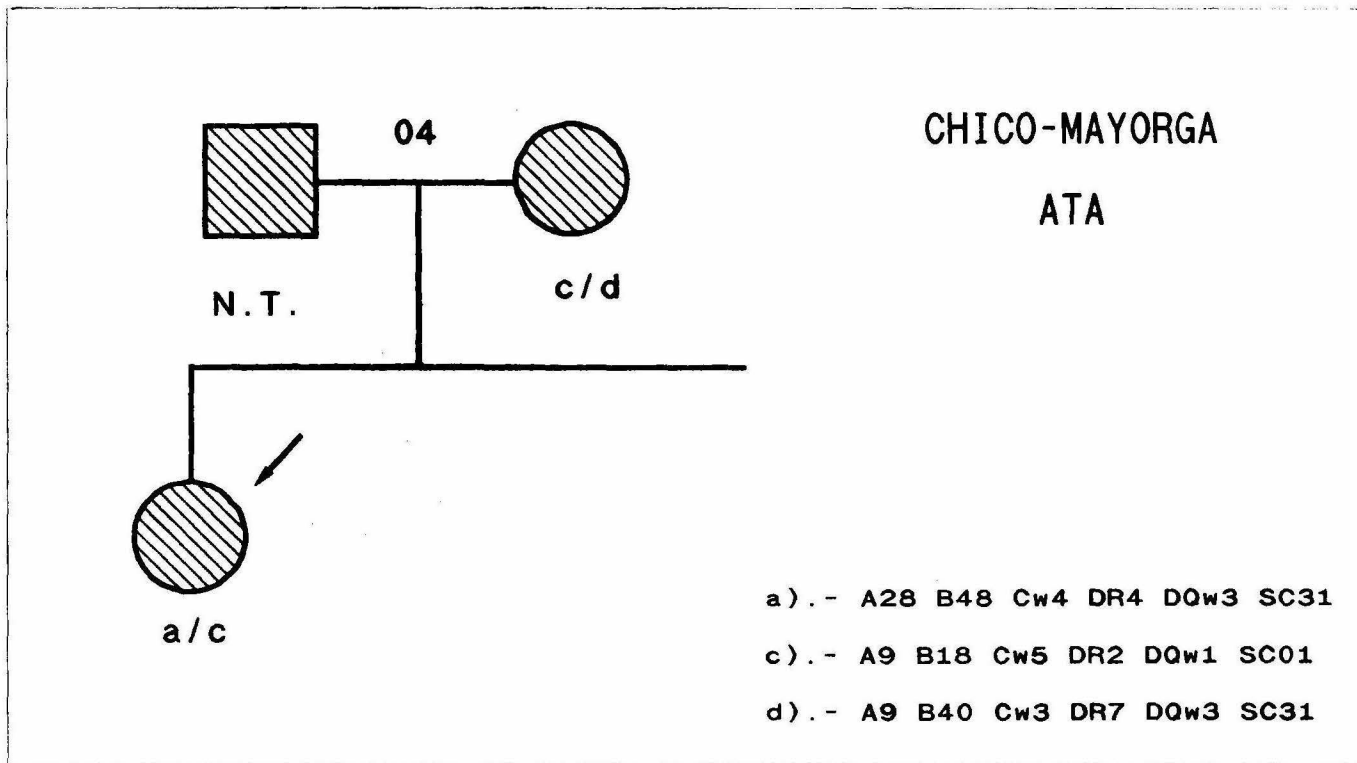
Los resultados del presente estudio demuestran que existe una predilección por la ausencia de expresión en el gen C4A mediados a nivel de la proteína, en pacientes con AT y deficiencia de IgA, lo que sugiere una base genética común de ambos trastornos. La AT no es una enfermedad homogénea y consecuentemente una concordancia completa es muy difícil de obtener asumiendo un defecto genético único. De cualquier manera implican fuertemente la existencia de genes dentro de la región MHC en la patogénesis del defecto de la diferenciación de las células B que caracteriza la deficiencia de IgA en pacientes con AT.

Algunos investigadores han mostrado incluso la existencia de

haplotipos extendidos que contienen alelos nulos del gen C4A (C4A*QO); nuestro estudio extendió dichas observaciones a la evaluación genotípica de los genes que codifican a las proteínas C2, Factor B, C4A, C4B y los genes del Sistema HLA-A, B, C, DR, DQ.

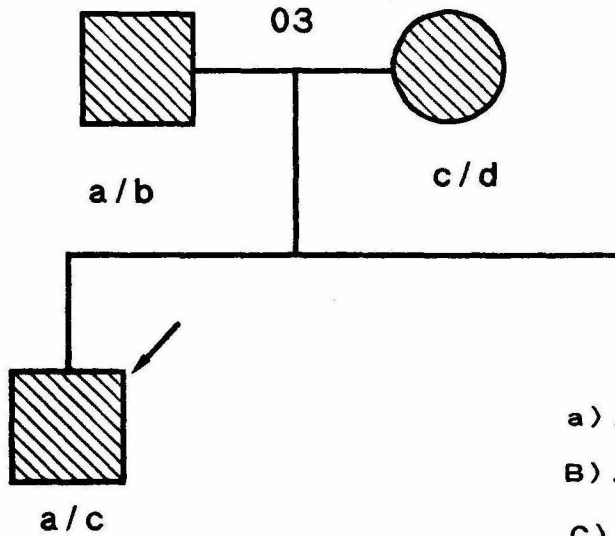
Las diferencias observadas en los antígenos HLA-DR y HLA-DQ en pacientes comparadas con los controles pueden explicarse por diferencias sutiles del origen étnico de ambos grupos, ya que los familiares y los pacientes no mostraron diferencias entre sí en estos dos loci.

Por otro lado, los resultados de la tabla 8 que mostraron diferencias en los pacientes con respecto a los genes clase III (complotipos) del Sistema Principal de Histocompatibilidad tanto con familiares como con los controles. Todo ello permite suponer que el gen o genes dentro del Sistema Principal de Histocompatibilidad que intervienen en la susceptibilidad genética a la Ataxia telangiectasia están probablemente cercanos a los genes de los complotipos.



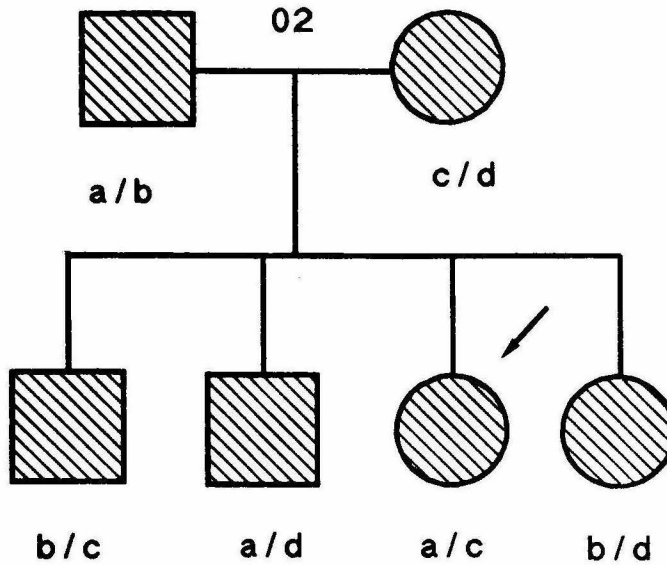
SANCHEZ-DOMINGUEZ

ATA

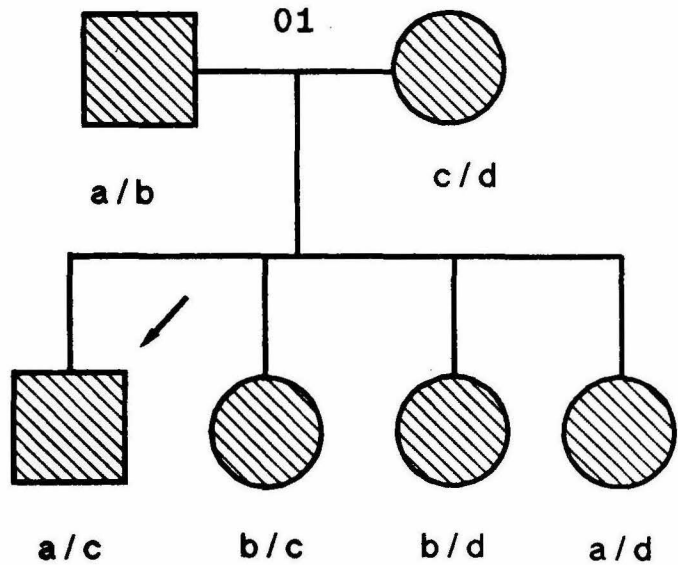


- a) . - A2 B13 Cw6 DR7 DQw2 SC31
- B) . - A2 B16 Cw4 DR5 DQw3 SC31
- C) . - A2 B22 CwX DR2 DQw1 SC01
- d) . - A2 B48 CwX DR4 DQw3 SC31

CHAVARRIA-SEPULVEDA
ATA



- a). - A1 B8 Cw7 DR3 DQw2 SC01
- b). - A2 B15 Cw3 DR4 DQw3 SC31
- C). - A11 B52 Cw4 DR6 DQw1 SC32
- d). - A10 B14 Cw8 DR1 DQw1 SC21



GONZALEZ-JIMENEZ

ATA

- a) . - A1 B8 Cw7 DR3 DQw2 SC01
- b) . - A2 B35 Cw4 DR4 DQw3 SC31
- c) . - A3 B12 Cw5 DR7 DQw2 FC31
- d) . - A10 B18 Cw5 DR3 DQw2 SC31

TABLA I.

LISTA DE HAPLOTIPOS DEL COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD EN LAS FAMILIAS MEXICANAS CON ATAXIA TELANGIECTASIA.

1.-	A1	B8	Cw7	DR3	DQw2	SC01
2.-	A2	B35	Cw4	DR4	DQw3	SC31
3.-	A3	B12	Cw5	DR7	DQw2	FC31
4.-	A10	B18	Cw5	DR3	DQw2	SC31
5.-	A1	B8	Cw7	DR3	DQw2	SC01
6.-	A2	B15	Cw3	DR4	DQw3	SC31
7.-	A11	B52	Cw4	DR6	DQw1	SC32
8.-	A10	B14	Cw8	DR1	DQw1	SC21
9.-	A2	B13	Cw6	DR7	DQw2	SC31
10.-	A2	B16	Cw4	DR5	DQw3	SC31
11.-	A2	B22	CwX	DR2	DQw1	SC01
12.-	A2	B48	CwX	DR4	DQw3	SC31
13.-	A28	B48	CwX	DR4	DQw3	SC31
14.-	A9	B18	Cw5	DR2	DQw1	SC01
15.-	A9	B40	Cw3	DR7	DQw3	SC31

TABLA 2.

*HAPLOTIPOS DEL COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD EN
PACIENTES MEXICANOS CON ATAXIA TELANGIECTASIA.*

1.-	A1	B8	Cw7	DR3	DQw2	SC01
2.-	A3	B12	Cw5	DR7	DQw2	FC31
3.-	A1	B8	Cw7	DR3	DQw2	SC01
4.-	A11	B52	Cw4	DR6	DQw1	SC32
5.-	A2	B13	Cw6	DR7	DQw2	SC31
6.-	A2	B22	CwX	DR2	DQw1	SC01
7.-	A28	B48	Cw4	DR4	DQw3	SC31
8.-	A9	B40	Cw3	DR7	DQw3	SC01

TABLA 3.

HAPLOTIPOS DEL COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD EN FAMILIARES SANOS.

1.-	A2	B35	Cw4	DR4	DQw3	SC31
2.-	A10	B18	Cw5	DR3	DQw2	SC31
3.-	A2	B15	Cw3	DR4	DQw3	SC31
4.-	A10	B14	Cw8	DR1	DQw1	SC21
5.-	A2	B16	Cw4	DR5	DQw3	SC31
6.-	A2	B48	CwX	DR4	DQw3	SC31
7.-	A9	B40	Cw3	DR7	DQw3	SC31

TABLA 4.

FRECUENCIAS DE ANTIGENOS DEL MHC EN NORMALES MESTIZOS MEXICANOS.

HLA	Frec. gen.	Frec. antig.
A2	0.282	0.484
A19	0.201	0.362
A9	0.160	0.294
A28	0.121	0.227
A1	0.077	0.148
A3	0.060	0.116
A10	0.056	0.109
A11	0.043	0.084

B16	0.152	0.281
B35	0.133	0.248
B40	0.104	0.197
B5	0.094	0.179
B12	0.089	0.170
B14	0.070	0.135
B15	0.061	0.118
B7	0.060	0.116
B21	0.046	0.090
B8	0.036	0.071

B18	0.034	0.067
B27	0.024	0.047
B17	0.022	0.044
B13	0.019	0.038
B41	0.012	0.024

DR1	0.090	0.150
DR2	0.075	0.150
DR3	0.070	0.130
DR4	0.370	0.570
DR5	0.110	0.190
DR6	0.075	0.140
DR7	0.065	0.130
DR8	0.100	0.190
DR9	0.020	0.040
DR10	0.020	0.040

DQw1	0.220	0.380
DQw2	0.125	0.230
DQw3	0.600	0.840

TABLA 5.*FRECUENCIA DE ALELOS HLA - A EN PACIENTES FAMILIARES Y CONTROLES.*

Alelo	Pac. [n=8]	Fam. [n=7]	Cont. [n=200]	P vs F	P vs C	F vs C
A1	0.250	-----	0.075	NS	NS	NS
A2	0.250	0.571	0.280	NS	NS	NS
A3	0.125	-----	0.065	NS	NS	NS
A9	0.125	0.142	0.160	NS	NS	NS
A10	-----	0.285	0.055	NS	NS	NS
A28	0.125	-----	0.120	NS	NS	NS

* NS: Diferencia no significativa al realizar el análisis estadístico.

P - Pacientes

C - Controles

F - Familiares

TABLA 6.*FRECUENCIA DE ALELOS HLA - B EN PACIENTES, FAMILIARES Y CONTROLES.*

Alelo	Pac. [n=8]	Fam. [n=7]	Cont. [n=200]	P vs F P	P vs C P	F vs C P
B5[52]	0.125	-----	0.095	NS	NS	NS
B8	0.250	-----	0.035	NS	0.003	NS
B12	0.125	-----	0.090	NS	NS	NS
B13	0.125	-----	0.020	NS	NS	NS
B14	-----	0.142	0.070	NS	NS	NS
B15	-----	0.142	0.060	NS	NS	NS
B16	-----	0.142	0.150	NS	NS	NS
B18	-----	0.142	0.035	NS	NS	NS
B22	0.125	-----	0.005	NS	NS	NS
B40	0.125	0.142	0.105	NS	NS	NS
B35	-----	0.142	0.135	NS	NS	NS

TABLA 7.

FRECUENCIA DE ALELOS HLA - DR EN PACIENTES, FAMILIARES Y CONTROLES.

Alelo	Pac. [n=8]	Fam. [n=7]	Cont. [n=200]	P vs F P	P vs C P	F vs C P
DR1	-----	0.142	0.090	NS	NS	NS
DR2	0.125	-----	0.075	NS	NS	NS
DR3	0.250	0.142	0.070	NS	NS	NS
DR4	0.125	0.428	0.370	NS	0.01	NS
DR5	-----	0.142	0.110	NS	NS	NS
DR6	0.125	-----	0.075	NS	NS	NS
DR7	0.375	0.142	0.065	NS	0.01	NS

DQ1	0.250	0.142	0.220	NS	NS	NS
DQ2	0.500	0.142	0.125	NS	0.01	NS
DQ3	0.250	0.714	0.600	NS	NS	NS

TABLA 8.

FRECUENCIA DE ALELOS DEL COMPLEMENTO Y COMLOTIPOS EN PACIENTES, FAMILIARES Y CONTROLES.

Alelo	Pac. [n=8]	Fam. [n=7]	Cont. [n=352]	P vs F P	P vs C P	F vs C P
FBS	0.875	1.000	0.809	NS	NS	NS
F	0.125	-----	0.167	NS	NS	NS
C2C	1.000	1.000	0.982	NS	NS	NS
C4AQ0	0.500	-----	0.176	0.01	0.01	NS
2	-----	0.142	0.053	NS	NS	NS
3	0.500	0.857	0.630	NS	NS	NS
C4B1	0.875	1.000	0.704	NS	NS	NS
2	0.125	-----	0.142	NS	NS	NS
Complotipo						
SC01	0.500	-----	0.128	0.004	0.002	NS
FC31	0.125	-----	0.002	NS	NS	NS
SC32	0.125	-----	0.017	NS	NS	NS
SC31	0.250	0.857	0.391	0.03	NS	0.05
SC21	-----	0.142	0.042	NS	NS	NS

IX. CONCLUSIONES

- 1.- Los pacientes con AT que cursan con inmunodeficiencia de IgA tienen un trastorno en la diferenciación de las células B que está asociado con uno o varios genes ubicados dentro del Complejo Principal de Histocompatibilidad, probablemente alrededor de los genes Clase III.
- 2.- El estudio de los genes del brazo corto del cromosoma seis podría ser revelante en la identificación de individuos portadores de este defecto genético.
- 3.- El estudio de familias (padres, hermanos) de pacientes con AT mediante sondas moleculares de los genes Clase III podría auxiliar en la identificación del gen de la deficiencia de IgA en pacientes con AT.
- 4.- Los estudios moleculares de los complotipos ayudarán a precisar la forma en que influye esta región en la susceptibilidad a padecer Ataxia telangiectasia en pacientes mexicanos.

X. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Henner K: Apros de la description par M me Louis Bar de "I' ataxia telangiectasia" Priorite de la description par Lad. Syllaba K. Henner en 1926, du r[eseau conjonctival. Rev Neurol 118: 60-63, 1968.
- 2.- Wells CE, Shy GM: Progressive familial choreoathetosis with cutaneous telangiectasia. J. Neurol Neurosurg Psychiatr 20: 98-104, 1957.
- 3.- Biemon A: Paleocerebellar atrophy with extrapiramidal manifestations in association with bronchiectasis and telangiectasis of the conjunctiva bulbi as a familial syndrome. in: Van Bogaert L, Radermecker J (eds): "Proceedings 1st International Congress of Neurological Sciences, Brussels, July, 1957. London, Pergamon Press, p 206, 1957.
- 4.- Hyamns SW, Reisner SH, Neuman E: The eye signs in ataxia telangiectasia. Am J Ophtalmol 62: 1118-1124, 1966.
- 5.- Aguilar MJ, Kamoshita S, Landing BH, Boder E, Sedgwick RP: Pathological observations in ataxia-telangiectasia, A report on 5 cases. J Neuropathol Exp. Neurol, 127: 659-676, 1968.
- 6.- Swift M, Sholman L, Perry M, Chase C: Malignant neoplasm in the families of patients with ataxia-telangiectasia. Cancer Res, 36: 209-215, 1976.
- 7.- Dunham I, Sargent CA, Trowsdale J, Campbell RD. Molecular mapping of the human major histocompatibility complex by pulsed field gel electrophoresis. Proc Natl Acad Sci (USA). 84: 7237-7241.
- 8.- Laurence, S.K., Smith, C.L., Srivastava, R., Cantor, C.R. Weisman, SM. (1987). Megabase scale mapping of the HLA gene complex by pulsed field gel electrophoresis. Science 235:1387-1380.
- 9.- Sargewnt, CA., Dunham, I., Trowsdale J., Cambell, RD. (1989). Human

- major histocompatibility complex contains genes for the major heat shock protein HSP70. Proc Natl Acad Sci USA 86:1968-70.
- 10.- Hkoller, 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: 897-904.
 - 11.- Trowsdale, J. (1987). Genetic and polymorphism class II antigens. Brit Med Bull 43:15-36.
 - 12.- Bodmer, JG., Kennedy, LJ., Lindsay, J., Wasik, AM. (1987) Applications of serology and the ethnic distribution of three locus HLA haplotypes. Brit Med Bull. 43:94-121.
 - 13.- Spies, T., Blanck, G., Bresnhan, M., Sands, J., Strominger, JL (1989). A new cluster of genes within the human major histocompatibility complex. Science 243:214-217.
 - 14.- Cavalli, S., Bodmer, F. (1980). The genetic of human population. APII. Segregation and linkage analysis in human pedigrees and the estimation of gene frequencies. pp:851.
 - 15.- Alper, CA., Awdeh, ZL., Raum, DD., Yunis, EJ. (1982). Hypothesis extended major histocompatibility complex hapotypes in man: role alleles analogous to murine mutants. Clin Immunol Immunopatho. 24:276-285.
 - 16.- Awdeh, ZL., Raum, DD., Alper, CA. (1981). Major histocompatibility complex (MHC) linked complement haplotypes (complotypes) (Abstract)/ Fed Proc. 40:1066
 - 17.- Strchan, T. (1987). Molecular genetic and polymorphism of class I HLA antigens. Brit Med Bull 43:1-14.
 - 18.- Strominger, JL. (1987). Structure of class I and class II HLA antigens. Brit Med Bull 43:81-93.

- 19.- Bjorkman, P.J., Saper, MA., Samraoui, B., et al. (1987). Structure of the human class I histocompatibility antigenes., HLA A2. *Nature*. 329:506-512.
- 20.- Bjorkman, PL., Sapper, MA., Samraoui, B., et al. (1987). The foreing antigen binding site and T cell recognitio regiois of class I histocompatibility antigens. *Nature*.229: 512-518.
- 21.- Klein, J. (1987) Origin of the major histocompatibility complex polimorphism the trans-species hypothesis. *Human Immunol* 19:155_162.
- 22.- Brown, J H., Jardetzky, T., Gorga JC., et al. Three dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA- DR1. *Nature* 364: 33-39, 1993.
- 23.- Cresswell, p (1987). Regulation of HLA class II antigena expression. *Brit Medd Bull*. 43:66-80.
- 24.- Black, G., Strominger, 1988. Molecular organization of the DQ subregion (DQ-DX-DV-DQ)of the human MHC and its evolutionary implications. *J Immunol*. 141:1734-1737.
- 25.- Bidewll, J. (1988). DNA-RFLP analysis and genotyping HLA-DR and antigens. *Immunol. Today* 9:18-22.
- 26.- Alper, CA., Raum, DD., Karp, S., Awdeh, ZL., Yunis, EJ. (1983). Serum complement "supergenes" of the histocompatibility complex in man (complotypes). *Vox Sang* 45:62-67.
- 27.- Alper, CA (1976). Inherited structural polimorphism in human C2: Evidence for genetic linkage between c2 and Bf. *J. Exp Med* 144:llll-lll5.
- 28.- Awdeh, ZL., Alper, CA. (1980). Inherited structural polimorphism of the fourth component of human complement (C4).*Poc Natl Acad Sci*.

- USA. 77:3576-3580.
- 29.- Campbell, RD. (1987). The molecular genetic and polymorphism of C2 and factor B. *Brit Med Bull* 43:37-49.
 - 30.- Carroll, MC., and Alper, CA (1987). Polymorphism and molecular genetic of human C4. *Brit Med Bull* 43:37-49.
 - 31.- Carroll, MC., Campbell, RD., Porte, RR. (1985). Mapping of steroid 21-hydroxylase genes adjacent to complement C4 genes in HLA, the major histocompatibility complex in man. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 82:521-525.
 - 32.- White, PC., Grossberger, D., Onufer, BJ., Chaplin, DD., et al. (1985) Two genes encoding steroid 21-hydroxylase are located near the genes encoding the fourth component of complement in man. *Proc Natl Sci. USA.* 82:1089-1093
 - 33.- Alper, CA., Boenisch, T., and Watson, L. (1972). Genetic polymorphism in human glycine-rich beta glycoprotein. *J Exp. Med* 135:69.
 - 34.- Dupont, B. (1987). Immunology of HLA nomenclature committee/Dupont, B, (Ed) Springer Verlag.
 - 35.- Tiwari, JL., and Terasaki, PI. (1987) HLA and diseases. New York, Springer Verlag.