

11281

6

20)

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
FACULTAD DE MEDICINA

DISTINCION ENTRE EL SINDROME DE ANTIFOSFOLIPIDO PRIMARIO (SaFP) Y EL SINDROME
DE ANTIFOSFOLIPIDO SECUNDARIO (SaFS) UTILIZANDO MARCADORES DEL SISTEMA
PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD.

T E S I S

Que para obtener el titulo de
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMEDICAS (INMUNOLOGIA)

p r e s e n t a

GILBERTO VARGAS ALARCON

Director de tesis: Dr. Julio Granados Arriola

México, D.F. 1994.

1

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Inmunología y Reumatología del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán.

El alumno fue becado por el Programa Universitario de Investigación en Salud. Dirección General del Personal Académico. UNAM.

Dedico la realización de este trabajo a:

Dr. Julio Granados mi maestro y amigo de siempre con quien me he formado académicamente y de quien he aprendido a valorar los triunfos y a tomar los errores como parte del aprendizaje. Gracias por sus enseñanzas.

Drs. Jorge Alcocer y Donato Alarcón Segovia por permitirme formar parte de su muy distinguido grupo de trabajo.

Drs. Antonio Cabral, Jorge Arellano, Luis Llorente, Edgar Zenteno, Fernando Larrea y Arturo Panduro por los importantes aportes a este trabajo.

A mi esposa por su sacrificio, apoyo y comprensión durante estos años.

INDICE GENERAL

	Pags.
TABLA DE CONTENIDO	
PUBLICACIONES ORIGINALES.	5
I. RESUMEN.	6
II. GENERALIDADES.	
II.1 Sistema Principal de Histocompatibilidad.	9
- Genes clase I.	10
- Genes clase II.	12
- Genes clase III.	13
II.2 HLA y enfermedad.	15
II.3 Síndrome de anticuerpos antifosfolípidos.	19
- Historia.	19
- Inmunología y patogénesis de los aFL.	20
- Características de los anticuerpos antifosfolípidos.	20
- Síndrome de anticuerpos antifosfolípido.	23
- Anticuerpos antifosfolípido inducidos por infecciones.	24
- Anticuerpos antifosfolípido inducidos por fármacos.	25
- SaF y su asociación con marcadores del SPH.	25
III. HIPOTESIS.	26
IV. OBJETIVOS.	26

V.	MATERIALES Y METODOS.	27
	V.1 Pacientes y controles.	27
	V.2 Criterios de clasificación para SaFS a LEG.	28
	V.3 Determinación de anticuerpos anticardiolipina.	29
	V.4 Tipificación de moléculas clase I y II.	29
	V.5 Tipificación de moléculas clase III.	30
	V.6 Tipificación molecular de alelos DRB y DDQB.	31
	V.7 Análisis estadístico.	40
VI.	RESULTADOS.	42
VII.	DISCUSION.	46
VIII.	CONCLUSIONES.	52
IX.	BIBLIOGRAFIA.	54
X.	TABLAS Y FIGURAS.	65

PUBLICACIONES ORIGINALES.

Del presente estudio se derivaron 4 trabajos que han sido presentados en congresos internacionales y que serán publicados en breve.

1.- Vargas-Alarcón G, Granados J, Bekker C, Weckmann AL, Alarcón-Segovia D. HLA-DR5 (DRB1*1201) is associated with the primary antiphospholipid syndrome in Mexican patients. (enviado a publicación).

2.- Granados J, Vargas-Alarcón G, Oria CV, Andrade F, Melín-Aldana H, Alcocer-Varela J, Alarcón-Segovia D. Relationship of anticardiolipin antibodies, antiphospholipid syndrome and HLA-DR7 in Mexican patients with systemic lupus erythematosus (SLE). (enviado a publicación).

3.- Granados J, Vargas-Alarcón G, Andrade F, Melín-Aldana H, Alcocer-Varela D, Alarcón-Segovia D. Role of HLA-DR alleles and complotypes through the ethnic barrier in Mexican SLE patients. (enviado a publicación).

4.- Vargas-Alarcón G, Canoso R, Granados J. Role of the major histocompatibility complex (MHC) genes in drug-induced antiphospholipid antibodies. (en preparación).

I. RESUMEN

Objetivos: Determinar los marcadores del sistema principal de histocompatibilidad (SPH) que se asocian con la presencia del síndrome de antifosfolípido tanto en su forma primaria (SaFP) como en la secundaria a lupus eritematoso generalizado (SaFS). Establecer, en los pacientes con lupus eritematoso generalizado (LEG), los marcadores que se asocian con la presencia del anticuerpo anticardiolipina (aCL) y diferenciarlos de los que lo están con la enfermedad autoinmune. Finalmente, comparar el síndrome primario y el secundario para conocer sus semejanzas y diferencias desde el punto de vista genético.

Pacientes y métodos: El estudio incluyó a 17 pacientes con SaFP y a 90 de sus familiares en primer grado; también se estudiaron 80 pacientes con LEG y a 378 de sus familiares. Como grupo control se incluyeron 100 individuos pertenecientes a 50 familias mexicanas sin historia clínica de enfermedad autoinmune. Además, como otro grupo de comparación se incluyeron 41 pacientes a quienes después del tratamiento con clorpromacina se les detectaron anticuerpos antifosfolípido (aFL). Los antígenos clase I y clase II se determinaron por la técnica de microlinfocitotoxicidad; además, los antígenos clase II fueron analizados subsecuentemente por oligotipificación usando oligonucleótidos específicos de alelo (ASO) después de la amplificación del DNA usando la técnica de reacción de polimerasa en cadena (PCR). Los antígenos clase III se definieron por medio de electroforesis de alto voltaje en gel de agarosa e inmunofijación con anticuerpos específicos. El análisis estadístico se realizó por medio de la prueba de chi-cuadrada y exacta de Fisher usando el programa estadístico EPISTAT.

Resultados: De los 80 pacientes con LEG, 52 (65 %) fueron positivos para aCL así como 63 de sus familiares. Treinta y siete de los 80 pacientes con LEG reunieron los criterios de clasificación para el SaFS a LEG, mientras que 17 se consideraron negativos para dicho síndrome. Todos los pacientes con SaFP fueron positivos para aCL, mientras que todos sus familiares fueron negativos. Los pacientes con LEG positivos para aCL presentaron aumentos significativos de los antígenos HLA-DR3 ($pC=0.04$), DR7 ($pC=0.005$) y DQ2 ($pC=0.003$). Los familiares en primer grado de estos pacientes que resultaron positivos para aCL, presentaron aumento significativo de la frecuencia del HLA-DQ2 ($pC=0.01$) así como incremento moderado en la frecuencia del antígeno DR7 ($p=0.019$). Por su parte, los pacientes con LEG negativos para aCL presentaron aumentos moderados en las frecuencias de los antígenos HLA-DR3 ($p=0.013$) y DQ2 ($p=0.021$) pero no del DR7. Así mismo, el grupo de pacientes con aFL inducidos por tratamiento con clorpromacina presentó un aumento significativo de la frecuencia del HLA-DR7 ($pC=0.008$, $RR=2.73$). El análisis en los pacientes con SaFS mostró aumento significativo del antígeno DR7 en aquéllos con el síndrome definido y probable ($pC=0.004$ y $pC=0.05$ respectivamente), mientras que la frecuencia de este mismo antígeno en los pacientes clasificados como dudosos y negativos fue semejante a la del grupo control. Por otro lado, los pacientes con SaFP presentaron aumento significativo de la frecuencia del antígeno HLA-DR5 ($pC=0.001$, $RR=4.4$), específicamente del subtipo molecular DRB1*1201 ($pC=0.01$, $RR=13.7$). Finalmente, la comparación entre los pacientes con el síndrome primario y aquéllos con el secundario mostró diferencias importantes, los primeros se caracterizaron por los antígenos HLA-DR5 y HLA-DQ3, mientras que los segundos por los antígenos HLA-DR7 y HLA-DQ2.

Conclusiones: El presente trabajo establece que los marcadores asociados con el SaFS son el HLA-DR3, DR7 y DQ2; de éstos, el que al parecer se asocia con la presencia del

anticuerpo es el HLA-DR7, mientras que los asociados con el fenómeno autoinmune son el HLA-DR3 y el DQ2. Por otro lado, el SaFP se asocia con el antígeno HLA-DR5 (DRB1*1200) cuya frecuencia en el SaFS está considerablemente disminuida. Estos dos grupos tienen diferencias genéticas, el SaFP se caracteriza por el HLA-DR5 y el DQ3 mientras que el SaFS por el HLA-DR7 y el DQ2. Esto sugiere que a pesar de ser dos entidades semejantes se requieren de diferentes marcadores genéticos para que en un individuo se establezca cualquiera de las dos condiciones clínicas. Finalmente, el estudio sugiere que el camino clínico de un paciente con autoinmunidad está genéticamente determinado por marcadores del SPH en el brazo corto del cromosoma seis humano.

II. GENERALIDADES

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). Este 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 (1-3).

Hacia el telómero se encuentra la región clase I del SPH, que tiene por lo menos 17 genes relacionados entre sí (4) 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, D0/DZ, DQ y DR), cada una por lo menos con un par de genes α y β (5). Dentro de la región de clase II se incluyen los determinantes HLA-Dw, los cuales se determinan por cultivo mixto de linfocitos (6). Entre las regiones clase I y clase II, se encuentra la región clase III, cuyos genes codifican 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-OHA 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- α y TNF- β) que están entre el HLA-B y la región clase III y el gen de una proteína con estructura periódica no común llamada RD, 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 se designan como: BAT-1, -2, -3, -4 y -5, así como también un gen llamado B-144 que es análogo a un gen con igual nombre que el del ratón (7). En 1989 se

encontraron dos loci de la proteína de "choque térmico", HSP70-1 y HSP70-2, situados entre los genes de clase III y el del factor de necrosis tumoral alfa (3).

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 expresan en linfocitos T en reposo, pero su expresión puede inducirse con mitógenos ó estímulos antígeno-específico. Ni los eritrocitos maduros ni los granulocitos expresan moléculas de clase II (8).

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 incluya a los genes HLA-A y -B ó a HLA-B y -DR ocurre con una frecuencia un poco menor de 1% del total de meiosis (9). 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 COMPLETOTOPO (10) 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 (11). Se constituyen de un par de cadenas polipeptídicas unidas no

covalentemente: una cadena pesada α , que es glicoproteica, transmembranal de 45 kilodaltones (kd) y una cadena ligera β , también glicoproteica, de 12 kd. La cadena α es polimórfica y es codificada por el HLA-A, -B ó -C y la cadena β , monomórfica, es la 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 de aminoácidos de material purificado de una línea celular humana linfoblastoide (12). Estas moléculas tienen dominios extracelulares, una región transmembranal y una cola citoplásmica corta. Se ha podido encontrar además la estructura tridimensional de una molécula clase I, el antígeno HLA-A2 por medio de cristalografía de rayos X (13). La cadena pesada α consta de tres dominios externos (α_1 , α_2 y α_3). Los dominios α_1 y α_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 (14), que es de esta forma presentado por la molécula del HLA al receptor del linfocito T.

La mayor diversidad de aminoácidos de los antígenos de clase I se halla en diferentes sitios en los dominios α_1 y α_2 , lo que se ha confirmado con experimentos de transfecciones génicas y por medio de reconocimiento con aloanticuerpos (11). El dominio α_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 polimórficas están en los residuos 1 al 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 por otras metodologías, aumenten a 50 para HLA-A y a más de 100 para HLA-B (15).

b) Genes clase II.

Los antígenos de clase II son determinantes primarios en la generación de respuestas proliferativas de linfocitos T en cultivo mixto de linfocitos (12) y pueden presentar antígenos al receptor del linfocito T. Estas moléculas se encontraron como impurezas en preparaciones de antígenos de clase I. Se constituyen de dos cadenas glicoproteicas, unidas no covalentemente, una pesada α monomórfica, de 33 kd y una cadena ligera β polimórfica, de 28 kd (5), 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 a la beta2-microglobulina de la molécula de clase I. Los dominios $\alpha 2$ y $\beta 2$ son del tipo de los dominios de las inmunoglobulinas, muy conservados y los dominios $\alpha 1$ y $\beta 1$ son polimórficos. Recientemente se obtuvo la estructura tridimensional por cristalografía de rayos X, de las moléculas de clase II (16), la cual tiene cierto parecido a 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, 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 (17).

De las cuatro subregiones de los genes de las moléculas de clase II, la subregión DP consta de dos pares de loci α y dos β , de los cuales $DP\alpha 2$ y $DP\beta 2$ parecen ser pseudogenes (genes que no codifican para proteínas). La subregión DZ/DO se constituye de los genes $DZ\alpha$ y $DO\beta$, pero como estos dos loci están separados por varios cientos de kilobases, quizá no formen un dímero α/β (5). La subregión DQ tiene dos genes α y dos β : incluye dos genes DX (α y β) y un gen $DV\beta$ entre los genes DQ y DX. La subregión DR tiene cuatro genes β : el $\beta 1$ codifica para las variantes de DR de DR1 al DR18, el $\beta 2$ es pseudogen, el $\beta 3$ codifica para el

determinante DRw52 y el β 4 para el determinante DRw53. Hay un gen DR α no polimórfico. Se expresan tres tipos de productos de clase II: DP, DQ y DR. No hay evidencias de que DZ α y D0 β se expresen como proteínas, aunque se ha encontrado RNAm normalmente poliadenilado, de ambos genes en células B. Pueden formarse pares de cadenas DQ α y DQ β en "trans", es decir, la cadena α 1 y β 1 codificadas cada una por uno de los dos cromosomas homólogos de un individuo. También se pueden combinar productos de diferentes loci, como DR α y DQ β , en ratones transfectados (5).

El polimorfismo de las moléculas de clase II se encuentra en las cadenas β de los antígenos HLA-DP, -DQ y -DR. Los residuos polimórficos están en cuatro 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 (12).

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

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 (18).

c) Genes clase III.

Los genes de clase III del SPH, después del HLA, forman el conjunto de marcadores genéticos más polimórfico del humano (19). 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 (20,21).

Las moléculas de C2 y del 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 (22). 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 (95kd), β (75 kd) y τ (30 kd). Se sintetiza como una sola cadena en el orden β - α - τ que luego se glicosila y se procesa intracelularmente; se secreta como una estructura de tres cadenas (23).

La enzima 21-hidroxilasa es un citocromo P-450. Cuando está ausente de manera total o parcial, provoca un defecto en el metabolismo esteroideo y causa entonces 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, de centrómero a telómero, es 21-OHB, C4B, 21-OHA, C4A, FB y C2.

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 (24,25).

Se ha sugerido que los genes de la 21-hidroxilasa se duplicaron junto con los dos genes de C4. Solo el locus 21-OHB es importante en la biogénesis de esteroides el otro es un pseudogen (23).

HLA Y ENFERMEDAD

Desde el descubrimiento de que las moléculas del HLA sirven como elementos de restricción para el reconocimiento de muchos patógenos, se pensó que este sistema podría estar relacionado con la predisposición para desarrollar algunas enfermedades. La primera indicación que apoyó esta hipótesis fue el descubrimiento hecho en ratones, en los que se mostró que el desarrollo de leucemia inducida por virus está asociada al complejo H-2. Estos hallazgos estimularon la investigación para la búsqueda de asociaciones similares en el humano, sin embargo, los primeros estudios sólo produjeron resultados que fueron ya sea negativos o dudosos.

Los avances ocurridos en el conocimiento de la genética y la biología de las moléculas clase I, II y III han estimulado la investigación en el área de la asociación de enfermedades con alelos de estos genes, especialmente por el papel que tienen en la regulación de la respuesta inmunitaria. En 1973 se reportó la asociación entre espondilitis anquilosante y el antígeno HLA-B27, desde entonces más de 50 enfermedades han sido descritas como asociadas con uno o más antígenos del SPH (26). Estas enfermedades se pueden incluir básicamente en tres grupos:

- 1.- Enfermedades asociadas a los antígenos clase I (principalmente las espondiloartropatías asociadas al B27).
- 2.- Enfermedades asociadas a los antígenos clase II principalmente con el locus HLA-DR.
- 3.- Enfermedades asociadas a los antígenos clase III.

El estudio de la relación entre marcadores del SPH y algunas enfermedades presenta varios problemas: en primer lugar, los alelos que se encuentran asociados con algunas enfermedades, también se encuentran presentes en la población normal; en segundo lugar, se

ha observado que en muchos casos un solo alelo se asocia con más de una enfermedad; y por último, dentro de una misma enfermedad, ésta no se asocia en el 100% de los casos con un solo alelo. Por lo anterior, se ha intentado determinar un mayor polimorfismo dentro de los alelos del HLA mediante el uso de la biología molecular; de esta manera, se han descrito subtipos de alelos que se encuentran asociados a algunas enfermedades. Aún más, se ha propuesto que no es un antígeno específico el que se asocia con un padecimiento, sino más bien que puede ser un epítipo que puede estar presente en varios alelos el que determina la susceptibilidad para una enfermedad, e incluso se ha encontrado que es un aminoácido el responsable de la susceptibilidad, como en la diabetes mellitus insulino dependiente que está asociada con la presencia de un aminoácido sin carga en la posición 57 de la cadena β del HLA-DQ.

Por otro lado, es factible, que el gen de susceptibilidad para una enfermedad esté dentro del SPH o que la enfermedad sea causada por genes recesivos, como ocurre en los casos de deficiencias de C2 y de C4 o en la hiperplasia adrenal congénita debida a la deficiencia del gen para la enzima 21-hidroxilasa. De la misma manera se ha demostrado un gen dentro del SPH que confiere susceptibilidad al desarrollo de hemocromatosis idiopática; en esta enfermedad, el poseer ambos haplotipos HLA en común con el caso índice, confiere mayor expresión bioquímica de sobrecarga de hierro y la aparición de síntomas clínicos que caracterizan a la enfermedad (27). Por otro lado, existen enfermedades como la ataxia cerebelosa en la que se han demostrado genes de susceptibilidad con forma de herencia dominante unidos al SPH.

La mayoría de las enfermedades estudiadas en relación con el SPH, muestran asociación, pero no se ha demostrado ligamiento; entre ellas cabe resaltar el caso de la espondilitis anquilosante con el B27, ya que esta asociación tiene uno de los riesgos relativos más elevados (>100); esta asociación se ha evidenciado en todas las poblaciones del mundo

hasta ahora estudiadas.

En cuanto a la participación de las moléculas clase II, es importante considerar que estas moléculas participan en los eventos de activación tanto en condiciones normales como en fenómenos autoinmunes. Su importancia radica en que estas moléculas están implicadas en los eventos de presentación antigénica, así como en la selección del repertorio de la célula T. A través de esos dos eventos, el polimorfismo del SPH controla aspectos tan importantes como la competencia inmune, la selección del repertorio de la célula T y la activación periférica. Debido a toda esta influencia que tienen las moléculas clase II en la respuesta inmune, es lógico que muchas enfermedades que involucran alteraciones inmunológicas sean asociadas específicamente con ciertos alelos polimórficos de la región clase II del SPH. Entre estas enfermedades tenemos a la diabetes mellitus insulino dependiente asociada con HLA-DR3, -DR4, o con ambos (DR3/DR4); la artritis reumatoide asociada con el DR4 y DR1 (28,29); la miastenia gravis asociada con el DR3 y DR7; el pénfigo vulgar asociado con el DR4 y DR6; la esclerosis múltiple asociada con el DR2 y DR3 (28).

Se han propuesto varias hipótesis para explicar el papel de los alelos del SPH en el establecimiento de la susceptibilidad a enfermedades (30).

Entre estas hipótesis se encuentran:

1.- La hipótesis de similitud molecular, la cual explica la susceptibilidad mediante reacción cruzada entre organismos infecciosos y un determinado antígeno del sistema HLA.

2.- La hipótesis del receptor, establece que ciertos antígenos HLA pueden actuar como receptores específicos para agentes infecciosos y que este evento está directamente relacionado con el desarrollo de la enfermedad.

3.- La hipótesis del antígeno HLA modificado, sugiere que los antígenos HLA están modificados químicamente por antígenos extraños y entonces el sistema inmunitario los

reconoce como extraños, respondiendo por lo tanto con la producción del autoanticuerpo correspondiente, generándose así el estado de enfermedad.

4.- La hipótesis de genes de respuesta inmune intenta explicar que la asociación ocurre como resultado de respuesta versus no respuesta a un determinante crítico que es propio del agente patógeno.

Desde luego, ninguna hipótesis en forma aislada explica todas las relaciones que se han registrado y bien pudiera ser que cada uno de estos mecanismos, esté involucrado ya sea en uno o varios de los procesos de enfermedad asociados con el SPH.

SINDROME DE ANTICUERPOS ANTIFOSFOLIPIDO.

Historia.

La asociación entre la presencia de anticuerpos antifosfolípidos (aFL) y manifestaciones clínicas fue reportada primeramente en pacientes con lupus eritematoso generalizado (LEG), quienes presentaban trombosis u otras manifestaciones vasculares periféricas, anticoagulantes circulantes y/o prueba serológica para sífilis falsa positiva (31). No obstante, fue hasta que se desarrollaron técnicas más sensibles y específicas para la detección de anticuerpos anticardiolipina (aCL), que se pudo conocer la verdadera magnitud de esta asociación. Con la aplicación del radioinmunoanálisis (RIA) (32) y posteriormente del ensayo inmunoenzimático (ELISA) (33), para la detección de los anticuerpos aCL, se hizo claro que en pacientes con LEG la presencia de anticuerpos antifosfolípido (aFL) puede asociarse con diversas manifestaciones clínicas que constituyen un síndrome dentro de la enfermedad (34). Posteriormente se encontró que el síndrome puede presentarse en pacientes con títulos altos de aFL y manifestaciones clínicas a las que se asocian estos anticuerpos, ésto en ausencia de datos clínicos o serológicos de otra enfermedad primaria, por lo que a esta enfermedad y se le denominó "síndrome de antifosfolípido primario" (SaFP) (35-37), y de esta manera distinguirlo del síndrome de antifosfolípido secundario (SaFS) que se presenta primordialmente en pacientes con LEG.

Inmunología y patogénesis de los aFL.

En 1906 Wasserman (38) describió un tipo de anticuerpo antifosfolípido que se asociaba con sífilis. Posteriormente se estableció que existían dos tipos de pruebas serológicas falsas positivas para sífilis, estas son: una aguda generalmente asociada con infecciones virales o bacterianas, una crónica asociada con la presencia de enfermedad vascular de la colágena (39).

El anticoagulante lúpico (AL) fue descrito por Conley y Hartman (40) en dos pacientes con complicaciones hemorrágicas, trabajos posteriores mostraron que no existía asociación con complicaciones en la coagulación (41,42) pero paradójicamente existía asociación del AL con trombosis (43-45). El AL prolonga los tiempos de coagulación dependientes de fosfolípidos in vitro por competición con factores de la coagulación por la unión a los fosfolípidos (46-48). La carencia de estandarización y el incremento en el interés en los anticuerpos antifosfolípidos y su asociación con varios tipos de trombosis llevó a Harris y colaboradores a desarrollar un radioinmunoanálisis en fase sólida y posteriormente un ensayo de ELISA para determinar dichos anticuerpos utilizando a la cardiolipina como antígeno (32).

Características de los anticuerpos antifosfolípido.

Los anticuerpos antifosfolípido (aFL) presentes en pacientes con sífilis no se asocian con complicaciones clínicas. Muchos investigadores han enfocado sus estudios hacia estos anticuerpos comparándolos con los aFL presentes en pacientes con LEG con el fin de establecer las diferencias entre estos dos anticuerpos. Se ha sugerido que la ausencia de complicaciones clínicas en pacientes con sífilis y pacientes con aFL inducidos por drogas y la

presencia de dichas manifestaciones en pacientes con LEG se deben a diferencias en el isotipo de dichos anticuerpos (49), variaciones en la avidéz del anticuerpo (50,51), distribución de la subclase de IgG (51,52) y también a la especificidad hacia el fosfolípido (53,54). Se sabe que el isotipo tiene gran importancia clínica, algunos autores han reportado que la IgG se asocia importantemente con las complicaciones clínicas (55,56-58). La subclase de IgG también puede reflejar la naturaleza del antígeno involucrado y que por tanto sea importante en la patogenicidad. En LEG, las subclases de IgG para anticuerpos anti-DNA de doble cadena, anti-SM y anti-RNP son predominantemente IgG1 e IgG3 (59-61), mientras que para anti-Ro, La y U1 RNP son predominantemente IgG1 (62). A diferencia de lo anterior, los anticuerpos aFL en estos mismos pacientes son predominantemente del isotipo IgG2 e IgG4 (51,52). Contrariamente a lo que ocurre en LEG, los anticuerpos aFL presentes en pacientes con sífilis son de los isotipos IgG1 e IgG3 (51). Las diferencias en la distribución de subclases implica variaciones en la inducción del autoanticuerpo y diferencias en los reareglos génicos y sugieren por tanto diferencias en el antígeno inductor o en la presentación antigénica. La presencia de IgG4 en los aFL presentes en LEG podría estar relacionado con la cronicidad del antígeno inductor ya que la IgG4 al parecer se presenta como respuesta a una inmunización prolongada y puede reflejar estimulación antigénica crónica (63,64). El tipo de cadena ligera en los aFL de pacientes con LEG es predominantemente lambda, mientras que en pacientes con sífilis predomina la cadena kapa.

La reactividad cruzada de los anticuerpos aFL con anticuerpos anti-DNA se ha sugerido por varios grupos (65-67), principalmente en base a las reactividades de anticuerpos monoclonales (66,67). Inicialmente se sugirió que la cabeza polar de los fosfolípido imitaba la base fosfodiéster del DNA. Trabajos posteriores se inclinan a pensar que los anticuerpos monoclonales de baja avidéz pueden reaccionar cruzadamente, mientras que los anticuerpos

de alta avidéz como los derivados de pacientes no presentan esta reactividad cruzada (68,69). Los anticuerpos aFL de pacientes con LEG al parecer presentan mayor avidéz que los anticuerpos de pacientes con sífilis (51), siempre y cuando esta avidéz se determine por métodos basados en la técnica de ELISA (50,70). Sin embargo, se desconoce si esta avidéz tiene algo que ver con el papel patogénico de estos anticuerpos.

Los aFL unen a fosfolípidos aniónicos tales como cardiolipina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol y ácido fosfátidico. La mayoría de los investigadores (49,51,71) han encontrado que los aFL no unen a fosfolípidos no aniónicos como fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina, sin embargo, un trabajo reciente, describe un paciente con AL y un anticuerpo reactivo contra fosfatidiletanolamina que además presentaba trombosis (72). Los primeros trabajos (54) sugieren diferencias en la especificidad de los anticuerpos aFL de pacientes con LEG y de pacientes con sífilis, sin embargo, actualmente se sugiere que ambos tienen las mismas especificidades en cuanto a los fosfolípidos que reconocen (50,51). Los aFL de pacientes con LEG son mejor inhibidos por cardiolipina en forma pura, mientras que los de los pacientes con sífilis son mejor inhibidos por cardiolipina como parte del antígeno VDRL (cardiolipina, colesterol y fosfatidilcolina) (51,54,73). lo cual sugiere que esos anticuerpos reconocen diferentes epítopes estructurales.

El epítpe reactivo en los fosfolípidos no ha sido bien definido, sin embargo, importantes componentes del epítpe han sido identificados. Ambos, el grupo fosfodiéster y la cabeza polar cargada negativamente parecen ser necesarios para la reactividad. La longitud y grado de saturación de la cadena de ácidos grasos también juega un papel importante (74).

Síndrome de anticuerpos antifosfolípido (SaF)

La existencia del SaF como una entidad clínica propia está cada vez más definida y delimitada. Diversas manifestaciones clínicas se correlacionan con la presencia de anticuerpos antifosfolípido en suero y aún en otros fluidos biológicos como orina (75). Las manifestaciones clínicas incluyen una alta frecuencia de oclusiones vasculares que habían sido originalmente observadas en pacientes con anticoagulante lúpico (AL) positivo y prueba serológica para sífilis falsa positiva (31,76). Uno de los trabajos más extensos y con mayor número de pacientes estudiados es el elaborado por Alarcón-Segovia y colaboradores en 1989 (77), en el que se estudiaron los aCl de 500 pacientes con LEG mediante ELISA, usando cardiolipina como antígeno. Las manifestaciones clínicas que se encontraron significativamente asociadas con la presencia de aFL a títulos altos fueron: trombosis venosa (particularmente las que se presentan en forma recurrente), trombocitopenia, anemia hemolítica, pérdida fetal repetida, livedo reticularis, úlceras en piernas, oclusiones arteriales, hipertensión pulmonar y mielitis transversa. Las tres últimas mostraron una asociación muy débil, al parecer debido a la baja frecuencia con la que se presentan en pacientes con LEG. Para definir mejor la significancia de la asociación los autores usaron dos estrategias, una de ellas fue el estudio de un número grande de pacientes con la manifestación clínica en cuestión (fuera del grupo de los 500 pacientes estudiados) y la otra fue investigar la presencia de las manifestaciones en pacientes con SaFP.

También se han asociado la presencia de aFL con valvulopatía cardíaca (78) y con hipoadrenalismo que se han encontrado en pacientes con SaFP (79). La corea no estreptocócica que también ha sido propuesta como relacionada a la presencia de aFL en LEG, no ha sido apoyada claramente en estudios mayores debido posiblemente a su baja frecuencia. Sin embargo, se ha visto que ocurre en pacientes con SaFP (80). Algunas manifestaciones

clínicas se asocian preferentemente con aFL de clase IgG, como son la pérdida fetal repetida, la trombosis venosa y la trombocitopenia, en tanto que se asocian con aFL de clase IgM la anemia hemolítica y la mielitis transversa.

Los pacientes con SaF pueden tener títulos altos de los aFL en forma persistente detectados por ELISA, aún cuando el ensayo de AL retorne a la normalidad. Ishii y colaboradores (81) analizaron un grupo de pacientes con LEG e identificaron dos subgrupos: uno que mostró persistentemente títulos altos de aFL y otro con incrementos eventuales pero generalmente con títulos bajos (normales) de los aFL. El subgrupo con aFL persistentemente altos presentan las manifestaciones clínicas asociadas al SaF, sin variación en los títulos del anticuerpo con la actividad de la enfermedad y una baja frecuencia de nefritis lúpica. El subgrupo con títulos intermitentemente altos presenta sólo algunos síntomas del SaF, los títulos de los anticuerpos aumentan con los períodos de exacerbación de la enfermedad y tienen una alta frecuencia de nefritis lúpica.

Anticuerpos antifosfolípido inducidos por infecciones.

El primer antifosfolípido reportado fue el relacionado con sífilis, que posteriormente se usó para el diagnóstico serológico de esta enfermedad. En procesos infecciosos virales también se han podido demostrar el incremento en los títulos de aFL (82). En pacientes con el virus de inmunodeficiencia adquirida (HIV), el incremento de los títulos de estos anticuerpos se ha atribuido a infecciones oportunistas (83,84), sin embargo, Maclean y colaboradores proponen que el virus es por si mismo capaz de inducir la producción de aFL (85).

Anticuerpos antifosfolípido inducidos por fármacos.

A algunos pacientes que reciben tratamiento con clorpromacina se les han detectado títulos altos de aFL (86), este fármaco, puede a su vez inducir LEG (87), así como en algunos casos, la producción de anticuerpos antinucleares en ausencia de manifestaciones clínicas de lupus o cualquier otra enfermedad autoinmune (88).

SaF y su asociación con marcadores del SPH.

Los estudios reportados a este respecto son en la actualidad muy pocos debido a su vez a lo nuevo de esta enfermedad.

Los trabajos realizados hasta la fecha se han enfocado al estudio de los alelos de genes clase II (HLA-DR y -DQ) como posibles marcadores de susceptibilidad para enfermedades autoinmunes (89,90). En cuanto a la relación del SaF con estos alelos, se han reportado trabajos en los cuales se utilizan técnicas tanto serológicas como moleculares. Así, Savi y colaboradores (91) reportaron una frecuencia elevada del HLA-DR7 en pacientes del norte de Italia con LEG y anticuerpos anticardiolipina. McHugg y Maddison (92) por su parte reportaron una mayor frecuencia del alelo HLA-DR4 en pacientes ingleses y finalmente Arnett y colaboradores (93) al estudiar 20 pacientes con anticoagulante lúpico utilizando técnicas moleculares, mostraron aumento de la frecuencia del DQw7, y en menor grado de los antígenos HLA-DR5 y HLA-DRw52. En cuanto al SaFP, recientemente Asherson y colaboradores (94) al estudiar 13 pacientes ingleses reportaron una frecuencia elevada del HLA-DR4 y del HLA-DRw53.

III. HIPOTESIS.

Existe un marcador del sistema principal de histocompatibilidad más frecuente en sujetos afectados por el síndrome de antifosfolípido primario que en los sujetos normales y a su vez dicho marcador puede ser diferente al que se encuentra en los pacientes con lupus eritematoso generalizado que también presentan el síndrome de antifosfolípido aunque en este caso es de forma secundaria a la enfermedad. Ya que en el SaFS se conjuntan manifestaciones clínicas y presencia de un anticuerpo, es posible que diferentes marcadores se asocien con cada una de estas entidades.

IV. OBJETIVOS.

1.- La tipificación de las moléculas clase I (HLA-A, -B y -C) , clase II (HLA-DR y -DQ) y clase III (C2, C4 y FB) del sistema principal de histocompatibilidad en 17 sujetos con síndrome de antifosfolípido primario.

2.- Tipificar todos estos marcadores en los familiares consanguíneos en primer grado del mismo grupo de enfermos.

3.- Tipificar los marcadores anteriores en otro grupo de 80 pacientes con LEG con y sin anticuerpos antifosfolípido, así como en sus familiares en primer grado..

4.- De los pacientes anteriores determinar sus características clínicas y establecer si tienen o no el síndrome de antifosfolípido.

5.- Estudiar a 41 pacientes quienes después del tratamiento con clorpromacina producen anticuerpos antifosfolípido (medido como anticoagulante lúpico).

V. MATERIALES Y METODOS

Pacientes:

1.- Pacientes con SaFP: El estudio incluye 17 familias mexicanas (personas emparentadas en primer grado: padres, hermanos y/o hijos, residentes en la República Mexicana con al menos tres generaciones nacidas en México según información proporcionada por los familiares) con al menos 1 caso índice (CI) (Individuo mayor de 18 años, seguido en el Departamento de Inmunología y Reumatología del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán), que reúne los criterios propuestos por Sanchez y colaboradores para Síndrome de Antifosfolípido Primario (SaFP). De las 17 familias, se tipificaron a 17 pacientes y 90 familiares sanos teniendo un total de 34 haplotipos enfermos (heredados por el paciente) y 31 haplotipos sanos (no heredados por el paciente y sí por sus familiares sanos).

2.- Pacientes con LEG: El estudio incluyó además a 80 pacientes con LEG que reunían los criterios del Colegio Americano de Reumatología para esta enfermedad (95) y a 378 de sus familiares en primer grado. Todos los pacientes fueron mestizos mexicanos con tres generaciones nacidas en México. Todos los pacientes formaban parte de una cohorte de pacientes con LEG en la que se recolectaron diversas variables clínicas y de laboratorio como son la positividad aCL y datos clínicos que se correlacionan con la presencia del SaF entre otras.

Los datos clínicos de los pacientes fueron obtenidos únicamente de 54 de ellos ya que fueron los pacientes que debido al tiempo de seguimiento de la enfermedad se pudo establecer la presencia o ausencia del síndrome clínico, el cual fue clasificado de acuerdo a criterios previamente establecidos en nuestro departamento (96).

De los 54 pacientes definidos clínicamente, 8 presentaron el síndrome definido, 15 el síndrome probable, 14 el síndrome dudoso y 17 no presentaron el síndrome. Todo este grupo también incluyó el estudio de los familiares en primer grado de cada paciente.

3.- Pacientes con anticoagulante lúpico inducido por tratamiento con clorpromacina: Este grupo estuvo formado por 41 pacientes que por tener problemas de sistema nervioso central requirieron tomar clorpromacina, la cual les indujo la producción de anticuerpos antifosfolípido medidos por la presencia de anticoagulante lúpico.

Controles

1.- Como grupo control para el análisis serológico de los antígenos del SPH se incluyeron a 100 individuos obtenidos de 50 familias que no tenían casos de LEG o de otra enfermedad autoinmune. Todas estas familias fueron de mestizos mexicanos con por lo menos tres generaciones nacidas en México.

2.- En el grupo control para el análisis molecular se incluyeron a 25 sujetos no relacionados.

3.- El grupo de comparación de los pacientes caucásicos con anticoagulante lúpico inducido por clorpromacina incluyó a 100 sujetos caucásicos previamente reportados.

Criterios de Clasificación para el SaFS a LEG:

Se utilizaron con este fin los criterios para el SaF secundario a LEG reportados previamente por nuestro departamento (96). Esos criterios incluyen 4 categorías.

a. Definido: si se tienen dos o más manifestaciones clínicas que se asocien con los anticuerpos antifosfolípido (aFL) así como títulos altos de aFL (> 5 DS).

b. Probable: si se tienen por lo menos una manifestación clínica y títulos altos de aFL o al menos 2 manifestaciones y títulos bajos de aFL (> 2 , < 5 SD).

c. Dudoso: si se tienen dos o más manifestaciones pero no aFL, una manifestación y títulos bajos de aFL, o ninguna manifestación y títulos altos de aFL.

d. Negativo: si se tiene únicamente una manifestación y no aFL, títulos bajos y ninguna manifestación clínica.

Determinación de aCL:

Los aCL se determinaron en los pacientes con SaFP y SaFS a LEG así como en sus familiares en primer grado. Esta determinación se realizó por la técnica de ELISA utilizando cardiolipina como antígeno (Sigma Chemical, St. Louis, MO). El método usado fue el descrito por Loizou (33) modificado por Gharavi (49) y por nuestro laboratorio (97). Sueros positivos y negativos fueron donados por el Dr Hughes GRV en Londres para estandarización de la técnica. Los valores normales fueron determinados por nuestro laboratorio al estudiar a 100 sujetos sanos. Únicamente 4 de ellos mostraron una absorbancia mayor a dos desviaciones estándar (DS) de la media normal y ninguno presentó por arriba de 5 DS. Lo anterior se aplicó para los isotipos IgG e IgM estudiados con antisueros monoespecíficos. La media más dos DS fue considerada como positiva para los dos isotipos. Todos los individuos (pacientes y familiares) fueron probados para la presencia de aCL en por lo menos 5 consultas consecutivas.

Tipificación de antígenos clase I y II:

Se tomaron muestras de sangre (20 ml) de los pacientes, familiares y controles. Los linfocitos se obtuvieron de sangre periférica utilizando un gradiente de densidad (98) y las

células B fueron separadas con el reactivo de Lympho-Kwik (One lambda, California, USA). La tipificación serológica de los antígenos HLA-A, B y C fue realizada en células mononucleares con la técnica de microlinfocitotoxicidad (99) mientras que la tipificación de los antígenos HLA-DR y DQ se realizó en células B utilizando una técnica similar pero con tiempos de incubación más prolongados (100). Las placas de tipificación fueron obtenidas comercialmente (C-Six Diagnostics, Mequon, Wisconsin, EUA) y contenían un total de 210 antisueros, 140 para definir 40 especificidades de los loci HLA-A, B, C y 70 para definir 18 especificidades de los loci HLA-DR y DQ.

Tipificación de Antígenos clase III:

El factor B (FB) (101) y C4 se tipificaron mediante electroforesis de alto voltaje en gel de agarosa e inmunofijación con anticuerpos específicos anti-FB y anti-C4 respectivamente (Atlantic Antibodies, Stillwater, Minn, EUA). Para la tipificación de C4, previo a la electroforesis, la muestra se trató con neuraminidasa con el objeto de eliminar los carbohidratos que se añaden a la proteína después de su síntesis (21). El C2 se determinó por isoelectroenfoque de muestras de plasma en geles de poliacrilamida seguida de un ensayo hemolítico utilizando eritrocitos de carnero sensibilizados y suero humano deficiente en C2 (20). Los complotipos son presentados en un orden arbitrario como FB, C2, C4A, y C4B en su forma abreviada; así, el SC01 denota los alelos FB*S, C2*C, C4A*Q0, C4B*1.

Tipificación molecular de los alelos DRB y DQB.

La tipificación molecular de estos alelos se realizó utilizando la técnica de amplificación de DNA por reacción en cadena de polimerasa, seguida de la hibridación del DNA amplificado utilizando sondas específicas para cada uno de los alelos conocidos. Las sondas deben ser marcadas para su detección.

A. Equipo.

- 1.- Campana de extracción.
- 2.- Termociclador.
- 3.- Lámpara de rayos UV.
- 4.- Incubadora para hibridación.
- 5.- Baños de agua.
- 6.- Fuente de vacío.
- 7.- Cámara fotográfica.

B. Material.

- 1.- Tubos falcon de 50 ml esteriles.
- 2.- Pipetas pasteur.
- 3.- Micropipetas de 20 y 100 μ l.
- 4.- Tubos Ependorf de 2.5 ml.
- 5.- Bolsas de hibridación.
- 6.- Película de rayos X.
- 7.- Películas fotográficas.

C. Reactivos.

- 1.- Amortiguador Salino de Fosfatos.
- 2.- Solución de lisis (AKC) (NH_4Cl 0.155M + K_2CO_3 0.01M).
- 3.- Solución RCB (NaCl 10mM + Tris-base 10 mM + EDTA 25 mM).
- 4.- Amortiguador Tris-EDTA.
- 5.- Amortiguador de Tris-Base 0.5 M, pH 8.0.
- 6.- Solución de Duodecil Sulfato de Sodio (SDS) al 10 %.
- 7.- Proteinasa K (10 mg/ml).
- 8.- Fenol.
- 9.- Cloroformo.
- 10.- Alcohol etílico absoluto.
- 11.- Iniciadores derecho e izquierdo para las regiones DRB y DQB.
- 12.- Cloruro de Magnesio.
- 13.- Deoxinucleótidos (ATP, CTP, GTP y TTP).
- 14.- Taq polimerasa.
- 15.- Agarosa al 1 %.
- 16.- Bromuro de etidio (10 mg/ml).
- 17.- Solución de Naranja G (10 ml de Ficoll al 20 %, 2 gr de Tris-base y suficiente Naranja G para dar color).
- 18.- NaOH 0.5 M.
- 19.- NaCL 1.5 M.
- 20.- Tris-base 0.5 M pH=7.4.
- 21.- Terminal transferasa.
- 22.- CoCl 25 mM.

- 23.- Oligonucleótidos (sondas) en concentración de 10 pmoles/ μ l.
- 24.- Digoxigenina (ddUTP-Dig) en concentración de 1 nmol/ μ l.
- 25.- EDTA 0.2 M pH=8.0.
- 26.- Glicógeno.
- 27.- LiCl 4 M.
- 28.- Etanol al 70 %.
- 29.- Membranas de Nylon.
- 30.- Solución de Hibridación. SSPE 6X, Solución Denhardt 5X, Lauril-sarconine de sodio 0.1 %, SDS 0.02 %.
- 31.- SSPE 30X: NaCl 4.5 M, NaH_2PO_4 0.3 M, EDTA 30 mM.
- 32.- Solución Denhardt: PVP y Ficoll 400 al 2 %, 2 g de Albumina sérica bovina.
- 33.- Solución de Cloruro de tetrametil amonio 5 M (TMAC).
- 34.- Solución de revelado 1: Ac Maleico 0.1 M, NaCl 0.15 M.
- 35.- Solución de revelado 2: Amortiguador 1 más 0.3 % de Tween 20.
- 36.- Solución de revelado 3: Solución de bloqueo diluida 1:10 en amortiguador 1.
- 37.- Solución de revelado 4: Tris-Base 0.1M pH=9.5, NaCl 0.1M y MgCl_2 50 mM.
- 38.- Solución de bloqueo: Reactivo de bloqueo al 10 % en amortiguador 1.
- 39.- Anticuerpo anti-digoxigenina acoplado a fosfatasa alcalina.
- 40.- Amortiguador de revelado 4: Tris 0.1 M pH=9.5, NaCl 0.1 M y MgCl_2 50 mM.
- 41.- Dioxetano.

D. Material biológico.

- 1.- 20 ml de sangre con EDTA.

E. Técnicas.

Extracción del DNA (102).

- 1.- Colocar 20 ml de sangre (EDTA) en un tubo Falcon de 50 ml.
- 2.- Agragar 30 ml de PBS y centrifugar a 2000 rpm durante 10 minutos.
- 3.- Tirar el sobrenadante y al paquete agregarle 50 ml de solución de lisis (AKC), incubar por 30 minutos e inmediatamente centrifugar a 1500 rpm durante 10 minutos.
- 4.- Descartar el sobrenadante y colocar PBS, agitar y centrifugar a 1500 rpm durante 5 minutos.
- 5.- Descartar el sobrenadante y agregar AKC, agitar y centrifugar a 1500 rpm durante 5 minutos.
- 6.- Descartar el sobrenadante y agregar PBS, agitar y centrifugar a 1500 rpm durante 5 minutos.
- 7.- Descartar el sobrenadante y agregar 3 ml de amortiguador RCB, 300 μ l de SDS al 10 % y 100 μ l de proteinasa K (10 mg/ml). Incubar la mezcla durante toda la noche en baño maría a 65-70 °C.
- 8.- Al siguiente día, saturar el fenol utilizando Tris-Base 0.5 M pH=8.0 volumen a volumen.
- 9.- Sacar los tubos del baño y agregar a cada uno 3 ml de fenol saturado, agitar y centrifugar a 1500 rpm durante 5 minutos.
- 10.- Obtener la fase acuosa y a ésta agregarle nuevamente 3 ml de fenol saturado, agitar y centrifugar a 1500 rpm durante 5 minutos.
- 11.- Separar la fase acuosa y agregarle 2 ml de amortiguador de Tris-EDTA y 5 ml de cloroformo, agitar y centrifugar como en el punto anterior.

12.- Obtener la fase acuosa y agregarle otros 5 ml de cloroformo, agitar y centrifugar. Este paso se repite hasta que la fase acuosa quede cristalina.

13.- Separar la fase acuosa y agregar NaCl 5 M (la decima parte del volumen final, de manera que el NaCl quede a 0.5 M en la solución).

14.- La mezcla anterior se agita y se agrega etanol absoluto en proporción 1:4 V/V.

15.- El DNA precipitado se obtiene en un tubo ependorf de 2.5 ml. Este DNA se lava con etanol absoluto, el cual se desecha. El DNA se deja secar ya sea con N₂ ó a temperatura ambiente

16. Una vez seco, el DNA se hidrata ya sea con Tris-EDTA o con agua destilada y se guarda a -20 °C hasta su uso.

Amplificación por Reacción de Polimerasa en Cadena (PCR) (103,104).

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

Agua	1762.5 µl.
Amortiguador de PCR 10X	250.0 µl.
Deoxinucleótido 2 mM	250.0 ul.
Iniciador derecho	50.0 µl.
Iniciador izquierdo	50.0 µl.
Agitar bien y ponerla en hielo.	
Taq polimerasa	12.5 µl.

Antes de añadir la enzima a la mezcla, colocar 2 µl (0.5 µg) de los DNA en los tubos de PCR. Por ultimo, añadir 47.5 µl de la mezcla anterior a cada tubo (mezclando DNA y solución)

y añadir 2 gotas de aceite mineral.

Posteriormente los tubos son colocados en el termociclador, el cual, se programa con las siguientes condiciones, las cuales fueron estandarizadas en nuestro laboratorio.

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

Todo el proceso se realiza durante 30 ciclos.

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

Finalmente las muestras amplificadas son guardadas para realizar la hibridación.

Los iniciadores utilizados en el presente trabajo fueron aquéllos específicos para las regiones genéricas DRB, DQB además del específico para la región DRB3 (izquierdo y derecho en ambos casos). Sus secuencias son mostradas en la tabla 1.

Marcaje de las sondas (105).

Cada sonda en cantidad de 95 pmoles es mezclada con 4 μ l de amortiguador para terminal transferasa, 4 μ l de solución de CoCl 25 mM, 1 μ l de ddUTP-Dig (1 nmol/ μ l) y 1.5 unidades de terminal transferasa.

La mezcla se incuba a 37 °C durante 30 minutos y después se coloca en hielo.

Por otro lado, se mezcla 1 μ l de glicógeno con 200 μ l de EDTA 0.2 M pH=8.0, y de esta solución se añaden 2 μ l a la mezcla inicial.

El oligonucleótido marcado se precipita con 2.5 μ l de LiCl 4 M y 85 μ l de etanol absoluto pre-enfriado a -20 °C, mezclar bien y mantener a -70 o -80 °C durante 15 minutos y después a -20 °C durante 2 horas o toda la noche.

Centrifugar a 12.000 g durante 20 minutos a 4 °C, eliminar el sobrenadante y lavar el paquete con 60 μ l de etanol

Centrifugar a 12000 g durante 10 minutos a 4 °C, eliminar el sobrenadante y secar el tubo a vacío o al aire.

En el presente trabajo se utilizaron 57 oligonucleótidos en total, 21 para detectar las variantes genéricas del DRB y 36 para la detección de las variantes DQB (algunas de las cuales son mostradas en las tablas 2 y 3).

Hibridación (105,106).

Tratamiento de la membrana. La membrana de nylon es cortada en cuadro de 10 cm² y es marcada en cuadros pequeños de 1 cm². La membrana se humedece en agua destilada, posteriormente se coloca en una solución de SSPE 10X durante 15 minutos. Se seca en el horno a 60 °C.

Colocación de las muestras. En cada cuadro de 1 cm² se colocan 2 μ l del DNA amplificado. La membrana se seca a temperatura ambiente y luego en el horno a 80 °C (puede fijarse el DNA utilizando un transiluminador UV). Una vez colocado el DNA en la membrana se procede a desnaturalizarlo, colocando la membrana en una solución de NaOH 0.5M/NaCl 1.5M durante 5 minutos. Después de la desnaturalización, la membrana es neutralizada colocándola en una solución de NaCl 1.5M/Tris-Base 0.5M pH=7.4 durante 1 minuto. Finalmente la

membrana se hornea a 80 °C durante 10 minutos y se pone en el transiluminador UV por 3 minutos.

Hibridación. Las membranas que contienen el DNA amplificado, son pre-hibridadas en la solución de hibridación (0.1-0.2 ml/cm²) durante al menos 30 minutos a 42 °C en baño maría y utilizando bolsas de plástico selladas.

Después de lo anterior, las membranas son hibridadas en la solución de hibridación que contiene el oligonucleótido marcado con la digoxigenina (2 a 4 pmoles de sonda por cada ml de solución de hibridación). Esta solución también se agrega de 0.1 a 0.2 ml por cm² de membrana. Este proceso se realiza a 42 °C durante toda la noche.

Las membranas son posteriormente lavadas 2 veces (5 minutos cada una) con una solución de SSPE 2X y SDS 0.1% a temperatura ambiente con agitación utilizando para esto recipientes de plástico de tamaño apropiado al tamaño de la membrana. Por lo general se utilizan de 50 a 100 ml de solución de lavado por 100 cm² de membrana (suficiente para que la solución cubra completamente a la membrana). Posteriormente, la membrana se lava con una solución de TMAC 3M durante 10 minutos a temperatura ambiente y finalmente se lava 2 veces con esta misma solución durante 15 minutos a 59 °C (pueden lavarse juntas varias membranas de distintos oligonucleótidos).

La solución de hibridación con el oligonucleótido marcado puede conservarse a -20 °C y usarse nuevamente hasta 2 veces más.

Revelado por Quimioluminiscencia (105,106).

Después del último lavado con TMAC en el proceso de hibridación, se elimina el exceso de líquido poniendo la membrana sobre un papel filtro unos segundos, sin dejarlo secar (o sencillamente escurriendo bien la solución de TMAC).

Los lavados siguientes se realizan a temperatura ambiente, en agitación y utilizando recipientes de plástico. El volumen de lavado es de aproximadamente 50 a 100 ml de solución por 100 cm² de membrana (suficiente para cubrir las membranas).

Inmediatamente después de eliminado el exceso de TMAC, las membrans son lavadas en la solución de revelado 2 durante 5 minutos. Posteriormente lavadas en solución de revelado 3 durante 30 minutos. Incubar en solución 3 conteniendo el anticuerpo anti-digoxigenina (75 mU/ml) en una dilución de 1:10000 durante 30 minutos.

Lavar la membrana 2 veces durante 15 minutos cada vez con solución de revelado 2 y después de esto equilibrar la membrana durante 5 minutos en solución de revelado 4.

Incubar la membrana durante 5 minutos en la solución de revelado 4 conteniendo el sustrato de la fosfatasa alcalina (AMPPD) en cantidad de 0.1 mg de AMPPD/ml de solución 3 (dilución 1:100).

Eliminar el exceso de AMPPD poniendo la membrana unos segundos en papel filtro (no dejar secar). La solución diluida de AMPPD debe conservarse a 4 °C en oscuridad y reutilizarla varias veces.

Colocar la membrana en una bolsa nueva de hibridación y sellarla. Incubar a 37 °C durante 15 minutos en baño maría.

Finalmente, exponer la membrana en una película de rayos X a temperatura ambiente durante 1 a 3 horas. Se recomienda que se obtengan dos películas de cada membrana (de corta y larga exposición) con el fin de realizar una mejor interpretación de las mismas.

Deshibridación de la membrana. Una misma membrana puede servir para realizar varias hibridaciones para lo cual se requiere un adecuado lavado de la misma. Para lo anterior se incuba la membrana en una solución de NaOH 0.4M a 42 °C durante 20 minutos. Se quita el exceso de NaOH con papel filtro y la membrana se incuba en una solución de Tris-HCl 0.2M pH=8.0, SSPE 0.1X y SDS 0.1% a 42 °C durante 20 minutos con agitación constante. La membrana se deja secar a temperatura ambiente y se verifica la ausencia de oligo utilizando el transiluminador UV.

Análisis Estadístico.

Para el análisis estadístico se usaron las pruebas de chi-cuadrada (X^2).

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

Para poder establecer la probabilidad de 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 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 dió 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 de la prueba. Para todas las tablas de contingencia de 2×2 se considera un grado 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 este caso la prueba exacta de Fisher que nos da directamente el valor de "p".

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

El valor de p fue corregido multiplicándola por el número de comparaciones realizadas en las tablas de contingencia (10 para HLA-A, 16 para HLA-B, 8 para DR, 3 para DQ, y 8 para los complotipos) con el fin de dar más fuerza a la comparación

Se calculó el riesgo relativo (RR) para cada antígeno estudiado por el metodo de Woolf (producto cruzado).

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

VI. RESULTADOS

Anticuerpos anticardiolipina en pacientes con LEG, en pacientes con SaFP y en sus familiares en primer grado: De los 80 pacientes con LEG, 52 (65%) fueron positivos para aCL y los restantes 28 fueron negativos en por lo menos 5 determinaciones. De los familiares en primer grado 63 (16.6%) fueron positivos. Todos los pacientes con SaFP fueron positivos para aCL mientras que todos sus familiares fueron negativos (Tabla 4).

Relación entre pacientes con LEG positivos para aCL y antígenos del SPH: Se estudiaron las frecuencias génicas de los antígenos del SPH en los 52 pacientes aCL positivos; en sus 63 familiares positivos y en el grupo control. Las comparaciones de dichas frecuencias se muestran en la tabla 5. El grupo de pacientes presentó incremento en la frecuencia de los antígenos HLA-DR3 (pC=0.04, RR=2.7), DR7 (pC=0.005, RR=3.4) y DQ2 (pC=0.003, RR=2.5) al compararse con el grupo control. Por otro lado, la comparación de los familiares con el grupo control, mostró incremento significativo en la frecuencia del HLA-DQ2 (pC=0.01, RR=2.2) así como disminución en las frecuencias de los antígenos HLA-A28 (pC=0.02), B39 (pC=0.003), B60 (pC=0.03), DR4 (pC=0.008) y DQ3 (pC=10⁻⁵). Además, se notó incremento en la frecuencia del antígeno HLA-DR7 (p=0.019, RR=2.4) la cual no permaneció significativa al corregir el valor de p.

Al comparar los grupos de pacientes aCL positivos con sus familiares positivos, no se encontró ninguna diferencia estadísticamente significativa.

Las frecuencias génicas de los antígenos clase III se distribuyeron de igual forma en los tres grupos estudiados (datos no mostrados).

Relación entre pacientes con LEG negativos para aCL y antígenos del SPH: La tabla 6 muestra las frecuencias génicas de los antígenos clase I y clase II en este grupo de pacientes quienes después de por lo menos 5 determinaciones consecutivas para aCL permanecieron negativos así como su comparación con el grupo control. Los pacientes mostraron incremento moderado en la frecuencia del antígeno HLA-DR3 ($p=0.013$, $RR=2.8$) el cual no permaneció significativo después de corregir el valor de p . Así mismo, se observó una disminución en la frecuencia del DQ3 ($pC=0.01$).

Relación entre pacientes tratados con clorpromacina y antígenos del SPH: Las frecuencias génicas en este grupo de pacientes fue comparada con la correspondiente en su grupo control (Tabla 7). Los pacientes que desarrollaron anticoagulante lúpico después del tratamiento con clorpromacina presentaron aumento en la frecuencia del HLA-DR7 ($pC=0.008$, $RR=2.73$).

Relación entre el SaFS a LEG y antígenos del SPH: De los 80 pacientes con LEG, en 54 se contó con información clínica suficiente para clasificarlos según los criterios previamente descritos en la sección de pacientes y métodos. De esta forma, 8 se clasificaron con el síndrome definido, 14 con el probable, 15 se clasificaron como dudosos y 17 fueron negativos. Las frecuencia génicas de los antígenos del SPH en estos grupos de pacientes fueron comparadas con la frecuencia correspondiente en el grupo control (Tabla 8). Este análisis mostró incremento significativo de la frecuencia del HLA-DR7 en el grupo de pacientes con el síndrome definido ($pC=0.004$, $RR=6.5$) así como también en los clasificados como síndrome probable ($pC=0.05$, $RR=3.92$). La frecuencia de este antígeno en los pacientes dudosos y negativos para el síndrome fue similar a la frecuencia en el grupo control. Los cuatro grupos mostraron incrementos significativos de la frecuencia del HLA-DQ2; por su parte los pacientes

clasificados como dudosos mostraron además, incremento en la frecuencia del HLA-DR3 (pC=0.03, RR=4.8).

Relación entre el SaFP y los antígenos del SPH: Las diferencias significativas entre pacientes y controles se limitaron a los alelos de la región clase II del SPH (Tabla 9). El grupo de pacientes al compararse con el grupo control presentó incremento significativo en la frecuencia del antígeno HLA-DR5 (pC=0.001, RR=4.4) así como también disminución en la frecuencia del antígeno HLA-DRw53 (pC=0.04). Los familiares de estos pacientes por su parte presentaron únicamente disminución en la frecuencia del antígeno HLA-DQ3 (pC=0.009). Finalmente la comparación entre pacientes y familiares mostró únicamente disminución en la frecuencia del HLA-DR7 (pC=0.02) en el grupo de pacientes.

Las frecuencias génicas de los demás antígenos HLA-DQ y de los del complemento fueron similares en pacientes y controles.

Con el fin de estudiar con más detalle el alelo relevante (HLA-DR5) y poder definir sus subtipos moleculares, utilizamos oligonucleótidos específicos de alelo (ASO). Esta determinación se realizó en 21 pacientes con SaFP y en 25 sujetos control (Tabla 10). Con ello se encontró que el subtipo predominante en este grupo de pacientes es el DRB1*1201. Por otra parte se encontró un aumento importante en el riesgo relativo que confiere este subtipo (pC=0.01, RR=13.7).

Puesto que un punto de controversia son las semejanzas y diferencias genéticas que pudieran existir entre los pacientes que desarrollan el síndrome de antifosfolípido en forma primaria y aquellos que lo desarrollan secundariamente a otra enfermedad, decidimos comparar los marcadores genéticos del SPH en estos dos grupos de pacientes,

Comparación entre el SaFP y el SaFS con respecto a las frecuencias génicas de los antígenos del SPH: Las frecuencias génicas de los antígenos del SPH en los pacientes con SaFP fueron comparadas con las frecuencias en los pacientes con SaFS (Tabla 11). Este último grupo estuvo formado por los pacientes clasificados con síndrome definido y probable (n=22), lo anterior debido a que son los grupos que presentan tanto manifestaciones clínicas como positividad al anticuerpo. Al realizar estas comparaciones, se encontró que los pacientes con SaFP se caracterizan por los antígenos HLA-DR5 (pC=0.003 vs SaFS) y DQ3 (pC=0.02 vs SaFS), mientras que el grupo de pacientes con SaFS se caracterizó por los antígenos HLA-DR7 (pC=0.007 vs SaFP) y DQ2 (pC=0.002 vs SaFP).

VII. DISCUSION.

El presente trabajo establece que los antígenos del SPH asociados con la presencia del síndrome de antifosfolípido son el HLA-DR5, -DR3, -DR7 y -DQ2. El DR5 se asocia con la forma primaria, mientras que los otros tres lo hacen con la forma secundaria del síndrome. La presencia del HLA-DR3 en el grupo de pacientes con LEG negativos para aCL, en los pacientes con SaFS clasificados como dudosos y negativos (títulos bajos o ausencia de aCL) y además en los pacientes con LEG positivos para aCL, sugiere que este marcador parece estar asociado principalmente con el fenómeno autoinmune representado en este caso por el LEG. Por otro lado, la presencia del antígeno DR7 en los pacientes con SaFS clasificados como definidos y probables (presencia de aCL), en los pacientes con LEG positivos para aCL así como también en sus familiares positivos para el anticuerpo, y además en el grupo de pacientes con anticoagulante lúpico inducido por clorpromacina, sugiere que dicho marcador pudiera estar asociado principalmente con la presencia del anticuerpo (Figura 2).

Este reporte confirma la asociación del HLA-DR7 con los anticuerpos aCL en pacientes con LEG lo cual fue originalmente descrito por Savi y colaboradores en pacientes italianos (111) y difiere sin embargo, de aquéllos descritos por McHugh en pacientes Ingleses (112). La razón de esta discrepancia puede ser que el estudio italiano, al igual que el nuestro, consideró las positivities para los isotipos IgG e IgM, mientras que el estudio inglés únicamente consideró el isotipo IgG. Otras causas de la diferencias pueden ser variaciones en las frecuencias génicas de los antígenos relevantes en cada grupo étnico, tal es el caso del DR4 el cual es el antígeno más común en la población mexicana lo que hace difícil asociarlo con alguna enfermedad.

Ya que el SaFS en mexicanos se asocia con los antígenos HLA-DR3, -DR7, y -DQ2 es difícil separar los marcadores asociados a la autoinmunidad de aquéllos asociados con la

presencia del anticuerpo. Los resultados en los familiares positivos al anticuerpo ayudaron a separar estas dos condiciones. Así, los familiares positivos mostraron únicamente incremento del HLA-DR7 sugiriendo con ello que este marcador se asocia con la presencia del anticuerpo. Los datos en los pacientes negativos mostrados en la tabla 6 apoyan este mismo hecho ya que los antígenos con frecuencias incrementadas en este grupo fueron el DR3 y el DQ2 pero no el DR7. Estos pacientes negativos sin embargo, deben tomarse con precaución ya que a pesar de que se les han realizado por lo menos 5 determinaciones no sabemos si continúen siendo negativos en un futuro, por lo cual se requiere un seguimiento a largo plazo. El dato que apoya fuertemente la asociación del DR7 con la producción de los anticuerpos antifosfolípido es el obtenido en los pacientes que producen anticoagulante lúpico después del tratamiento con clorpromacina, estos pacientes presentan alteraciones de la coagulación pero ésto no se refleja en alteraciones clínicas.

Los datos en la tabla 8, en la cual se presenta la asociación del DR7 con el SaFS definido y probable, sugiere un papel preponderante del DR7 en el desarrollo del síndrome, sin embargo, debido a que los criterios para el síndrome incluyen tanto la presencia de manifestaciones clínicas como la del anticuerpo, ello hace difícil conocer si el DR7 se asocia principalmente con el síndrome clínico o con la presencia del anticuerpo, sin embargo como se mencionó, el hecho de que el DR7 esté presente en los familiares positivos para el anticuerpo, así como también el hecho de que los pacientes negativos para él no lo presenten, sugiere que dicho marcador está principalmente asociado con la presencia del anticuerpo pero que también puede ser un marcador del SaFS clínico.

El estudio realizado por Arnett en pacientes de Estados Unidos (113) utilizando técnicas moleculares establece un aumento de la frecuencia del DQ7 en los pacientes que presentaron anticoagulante lúpico, sin embargo la forma de determinar los anticuerpos en ese estudio hace

difícil realizar alguna comparación con los nuestros.

Es importante hacer notar que los trabajos que existen hasta la fecha no intentan separar la condición de autoinmunidad de la presencia del anticuerpo; es bien sabido que existen una gran cantidad de marcadores genéticos que se asocian con la producción de anticuerpos. El hecho de que las moléculas de histocompatibilidad principalmente las de clase II participen en los fenómenos de presentación antigénica hace pensar que algunas de estas moléculas puedan en algún momento presentar con mayor afinidad un antígeno para que se desencadene la producción del anticuerpo correspondiente; es decir, estas moléculas pueden estar más relacionadas con la producción de los anticuerpos que con todo el conjunto de fenómenos que conllevan a la enfermedad. Además, se debe considerar que las enfermedades a que nos referimos son demasiado complejas en su fisiopatogenia como para pensar que un solo marcador controle toda la serie de fenómenos que llevan a su desencadenamiento. El estudio de secuencias localizadas en el nicho de las moléculas clase II ha permitido definir secuencias semejantes en diferentes marcadores, estas secuencias podrían ser las responsables de unir antígenos determinados y producir anticuerpos contra ellos.

Este estudio reporta una asociación entre el DR7 y la presencia de los aCL en un grupo étnico con una mezcla génica predominantemente de origen indígena y diferente a la población en la cual se reportó inicialmente, apoya el papel de este antígeno en la producción del anticuerpo. Nosotros incluimos la relevancia del DR7 en el desarrollo del síndrome clínico pero nuestro intento de separar la asociación de los antígenos del SPH con la presencia del anticuerpo y con la presencia del síndrome, pueden requerir estudios adicionales incluyendo secuencias en otros grupos étnicos ya que este es el primer trabajo que estudia de manera directa este punto.

En lo referente al SaFP únicamente se ha reportado un estudio realizado en pacientes

ingleses los cuales presentaron una frecuencia elevada del antígeno HLA-DR4 y HLA-DRw53 (114); esto no fue así en nuestros datos ya que encontramos incrementado el DR5 mientras que el DR4 y el DRw53 presentaron frecuencias semejantes a las del grupo control. Nuevamente estas discrepancias pueden deberse al distinto origen étnico de los pacientes. Debido a que los criterios de clasificación para este grupo de pacientes incluye tanto a manifestaciones clínicas como a la positividad al anticuerpo aunado a que todos sus familiares fueron negativos para el anticuerpo, es difícil saber si el marcador está asociado con el síndrome o con la presencia del anticuerpo.

El HLA-DR5 presenta 2 subtipos detectados por técnicas moleculares. Dichas técnicas fueron aplicadas en el presente trabajo y logramos establecer que el marcador asociado al SaFP es específicamente el DRB1*1201. Es importante hacer notar que cuando se realizó dicho análisis molecular, el riesgo relativo fue considerablemente mayor comparado con el que se reporta con el análisis serológico (13.7 vs 4.4). Esto se debe a que de los dos subtipos del DR5 reportados, el DRB1*1201 es el menos frecuente en la población normal mexicana (2.0%) y dado que este es el subtipo portado por la mayoría de los pacientes (21.4%) es lógico que se eleve el riesgo relativo en los pacientes que lo portan.

El hecho de que el subtipo asociado en esta enfermedad sea el DRB1*1201, es importante debido a que en otro estudio realizado por nosotros en pacientes con escleroderma, se reportó una alta frecuencia del DR5, pero a diferencia de este estudio, en ese trabajo el subtipo predominante fue el DRB1*1100, a pesar de ser muy frecuente en nuestra población. Lo anterior indica que las pequeñas variaciones existentes entre los diversos subtipos pueden ser importantes en conferir la susceptibilidad a una u otra entidad clínica.

Un punto importante que es abordado por nuestro trabajo y que no se había considerado en otros, es lo referente a las diferencias y semejanzas genéticas entre los pacientes que

presentan el síndrome primario y los que lo desarrollan de forma secundaria. Nosotros pudimos realizar dichas comparaciones debido a la conformación de una base de datos cuidadosamente construida, lo que permitió contar con una cohorte de pacientes bien seleccionados tanto desde el punto de vista clínico como de laboratorio. Los resultados de este análisis mostraron una diferencia importante ya que los pacientes con el SaFP se caracterizan por los antígenos HLA-DR5 y DQ3, mientras que los pacientes con SaFS a LEG presentan los antígenos HLA-DR7 y DQ2. Como vemos, únicamente se agrega el DQ3 en el SaFP a los marcadores que se habían encontrado al realizar el análisis con el grupo control. La alta frecuencia de los dos antígenos DQ sin embargo, puede deberse al elevado desequilibrio de unión que existe entre estos y los alelos DR (DQ3 con DR5 y DQ2 con DR7).

El poder diferenciar a estos grupos desde el punto de vista genético permite agregar otras diferencias a las ya existentes entre esas dos entidades. Es muy claro que estas entidades tienen un fondo de susceptibilidad genético particular a pesar de ser semejantes en sus manifestaciones clínicas. El hecho de que una se presente en forma secundaria, indica, como se demostró en este trabajo, que existen marcadores adicionales que condicionan este fenómeno, en este caso creemos que el marcador que da el fondo de autoinmunidad en los pacientes con LEG es el HLA-DR3. Este marcador se asocia en sujetos caucásicos con varias enfermedades autoinmunes como el propio LEG (107,108). En pacientes mexicanos lo hemos encontrado asociado con lupus eritematoso generalizado, enfermedad mixta del tejido conectivo y artritis reumatoide. La frecuencia de este marcador en la población mexicana es relativamente baja, mientras que en la población caucásica es el marcador con la mayor frecuencia. Por lo anterior, consideramos que este marcador ha sido adquirido en la población mexicana por mestizaje con la población caucásica.

En resumen, nuestros datos definen dos marcadores asociados con el síndrome de

antifosfolípido, el HLA-DR5 (DRB1*1200) asociado con la forma primaria y el HLA-DR7 asociado con la forma secundaria. En este último, consideramos que el marcador se asocia principalmente con la presencia del anticuerpo pero debido a que la clasificación del síndrome clínico implica la positividad al anticuerpo, también puede servir para diferenciar esta entidad clínica desde el punto de vista genético. El hecho de que este síndrome se presente en forma secundaria implica la existencia de otros marcadores que dan el fondo de autoinmunidad, esos marcadores son principalmente el DR3 y DQ2. La comparación entre el síndrome primario y el secundario, independientemente de su análisis con el grupo control, apoya las diferencias genéticas entre estas entidades clínicas en las cuales permanece el DR5 en la forma primaria y el DR7 en la forma secundaria. Lo anterior sugiere que a pesar de ser dos entidades semejantes se requieren diferentes marcadores genéticos para que se establezca cualquiera de las dos condiciones clínicas. Finalmente, los datos sugieren que el camino clínico que sigue un paciente con autoinmunidad, está genéticamente determinado por marcadores ubicados en el SPH en el cromosoma seis humano.

VIII. CONCLUSIONES.

- 1.- El SaF se asocia importantemente con marcadores del SPH, específicamente los de la región clase II.
- 2.- Los antígenos clase II asociados al SaF son el HLA-DR7, -DR3, -DQ2 y -DR5.
- 3.- De los marcadores anteriores, el DR7, DR3 y DQ2 se asocian al SaFS a LEG.
- 4.- La presencia del HLA-DR3 en el grupo de pacientes con LEG negativos para aCL, en los pacientes clasificados como dudosos y negativos para el SaFS (títulos bajos o ausencia de aCL) y además en los pacientes con LEG positivos para aCL, sugiere que este marcador está asociado principalmente con el fenómeno autoinmune representado en este caso por el LEG.
- 5.- Los pacientes con SaFS clasificados como definido y probable (presencia de aCL) presentaron asociación con el antígeno HLA-DR7.
- 6.- El DR7 se asocia a su vez con la presencia de anticoagulante lúpico inducido por el tratamiento con clorpromacina.
- 7.- Esta asociación además de la presencia de este antígeno en los pacientes con SaFS clasificados como definidos y probables, así como en los pacientes con LEG positivos para aCL así como también en sus familiares positivos, sugiere que este marcador se asocia con la presencia del anticuerpo.
- 8.- Debido a que los criterios de clasificación para el SaFS clínico incluyen tanto manifestaciones clínicas como la presencia del anticuerpo, el HLA-DR7 puede ser un buen marcador para esta entidad clínica.
- 9.- El DR5 específicamente el subtipo DRB1*1201 se asocia fuertemente con la presencia del SaFP.
- 10.- Los resultados del presente trabajo permiten diferenciar claramente al SaF que ocurre en

forma primaria de aquél que lo hace en forma secundaria en este caso al LEG utilizando los marcadores clase II del SPH.

IX. BIBLIOGRAFIA

- 1.- 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*. 1987; 84: 7237-41.
- 2.- Lawrence SK, Smidth CL, Srivastava R, Cantor CR, Weissman SM. Megabase scale mapping of the HLA gene complex by pulsed field gel electrophoresis. *Science* 1987; 235: 1387-90.
- 3.- Sargent CA, Dunham I, Trowsdale J, Campbell RD. Human mayor histocompatibility complex contains genes for the mayor heat shock protein HSP70. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 1968-70.
- 4.- Koller BH, Geraghty DE, Shlmizu Y, De Mars R, Orr HT. HLA-E: A novel HLA class I gene expressed in resting T lymphocytes. *J Immunol* 1988;. 141: 897-904.
- 5.- Trowsdale, J. Genetic and polymorphism class II antigens. *Brit Med Bull* 1987; 43: 15-36.
- 6.- Bodmer JG, Kennedy LJ, Lindsay J, Wasik AM. Applications of serology and the ethnic distribution of three locus HLA haplotypes. *Brit Med Bull*. 1987; 43: 94-121.
- 7.- Spies T, Blanck G, Bresnahan M, Sands J, Strominger JL. A new cluster of genes within the human major histocompatibility complex. *Science* 1989; 243: 214-7.
- 8.- Cavelli S, Bodmer F. The genetic of human population. APlI. Segregation and linkage analysis in human pedigrees and the stimation of gene frequencies. 1980; pp: 851.
- 9.- Alper CA, Awdeh ZL, Raum DD, Yunis EJ. Hypothesis extended major histocompatibility complex haplotypes in man: role of alleles analogous to murine t mutants. *Clin Immunol Immunopathol* 1982; 24: 276-85.
- 10.- Awdeh ZL, Raum DD, Alper CA. Major histocompatibility complex (MHC) linked complement haplotypes (complotypes) (Abstract). *Fed Proc* 1981; 40: 1066.

- 11.- Strachan T. Molecular genetic and polymorphism of class I HLA antigens. *Brit Med Bull* 1987; 43: 1-14.
- 12.- Strominger, JL. (1987). Structure of class I and class II HLA antigens. *Brit Med Bull* 43: 81-93.
- 13.- Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, et al. Structure of the human class I histocompatibility antigens, HLA-A2. *Nature* 1987a; 329: 506-12.
- 14.- Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, et al. The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature* 1987b; 329: 512-8.
- 15.- Klein J. Origin of the major histocompatibility complex polymorphism the trans-species hypothesis. *Hum Immunol* 1987; 19: 155-62.
- 16.- Brown JH, Jardetzky T, Gorga JC, Stern LJ, et al. Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature* 1993; 364: 33-9.
- 17.- Cresswell P. Regulation of HLA class I and class II antigens expression. *Brit Med Bull* 1987; 43: 66-80.
- 18.- Bidwell J. DNA-RFLP analysis and genotyping of HLA-DR and DQ antigens. *Immunol Today* 1988; 9: 18-22.
- 19.- Alper CA, Raum DD, Karp S, Awdeh ZL, Yunis EJ. Serum complement "supergenes" of the major histocompatibility complex in man (complotypes). *Vox Sang* 1983; 45: 62-7.
- 20.- Alper CA. Inherited structural polymorphism in human C2: Evidence for genetic linkage between C2 and Bf. *J Exp Med* 1976; 144: 1111-5.
- 21.- Awdeh ZL, Alper CA. Inherited structural polymorphism of the fourth component of human complement (C4). *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77: 3576-80.
- 22.- Campbell RD. The molecular genetics and polymorphism of C2 and factor B. *Brit Med Bull* 1987; 43: 37-49.

- 23.- Carroll MC, Alper CA. Polymorphism and molecular genetic of human C4. *Brit Med Bull* 1987; 43: 37-49.
- 24.- Carroll MC, Campbell RD, Porter RR. Mapping of steroid 21-hydroxylase genes adjacent to complement component C4 genes in HLA, the major histocompatibility complex in man. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 521-5.
- 25.- White PC, Grossberger D, Onufer BJ, Chaplin DD, et al. Two genes encoding steroid 21-hydroxylase are located near the genes encoding the fourth component of complement in man. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 1089-93.
- 26.- Tiwari JL, Terasaki PI. HLA and disease associations. *New York Springer Verlag* 1985.
- 27.- Basset ML, Halliday JW, Powell LW. HLA typing in idiopathic hemochromatosis distinction between homozygotes and heterozygotes with biochemical expression. *Hepatology* 1981; 1: 120-6.
- 28.- Nepom GT, Byers P, Seyfried C, et al. HLA genes associated with rheumatoid arthritis. Identification of susceptibility alleles using specific oligonucleotide probes. *Arthritis Rheum* 1989; 32: 15-21.
- 29.- Charron D. Molecular basis of human leukocyte antigen class II disease association. *Advances Immunol* 1990; 48: 107-59.
- 30.- McFarlane IG. Autoimmunity in liver disease. *Clin Sci* 1984; 67: 569-78.
- 31.- Bowie EJW, Thomson JH, Pascuzzi CA, et al. Thrombosis in systemic lupus erythematosus despite circulating anticoagulants. *J Lab Clin Med* 1963; 62: 416-20.
- 32.- Harris EN, Gharavi AE, Boey ML, et al. Anticardiolipin antibodies: detection by radioimmunoassay and association with thrombosis in systemic lupus erythematosus. *Lancet* 1983; 2: 1211-4.

- 33.- Loizou S, McCrea JD, Rudge AC, et al. Measurement of anticardiolipin antibodies by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Standardization and quantitation of results. *Clin Exp Immunol* 1985; 62: 738-45.
- 34.- Hughes GRV, Harris EN, Gharavi AE. The cardiolipin syndrome. *J Rheumatol* 1986; 13: 486-9.
- 35.- Alarcón-Segovia D, Sanchez-Guerrero J. Primary antiphospholipid syndrome. *J Rheumatol* 1989; 16: 482-8.
- 36.- Macworth-Young CG, Loizou S, Walport MJ. Primary antiphospholipid syndrome: features of patients with raised anticardiolipin antibodies and no other disorder. *Ann Rheum Dis* 1989; 48: 362-7.
- 37.- Asherson RA, Khamashta MA, Ordi-Rios J, Derksen RHW, Machin SJ, Barquinero J, Out HH, Harris EN, Vilardell-Torres M, Hughes GRV. The primary antiphospholipid syndrome: Major clinical and serological features. *Medicine (Balt)* 1989; 68: 366-75.
- 38.- Wasserman A, Neisser A, Bruck C, et al. The diagnostic reaction for syphilis. (Ger) *Deutch Med Wschr* 1906; 32: 484-9.
- 39.- Harvey AM, Shulman LE. Connective tissue disease and the chronic biologic false-positive test for syphilis (BFP reaction). *Med Clin North Am* 1966; 50: 1271-9.
- 40.- Conley CL, Hartman RC. A hemorrhagic disorder caused by circulating anticoagulant in patients with disseminated lupus erythematosus. *J Clin Invest* 1952; 31: 621-2.
- 41.- Schleider MA, Nachman RL, Jaffe EA, et al. A clinical study of the lupus anticoagulant. *Blood* 1976; 48: 499-509.
- 42.- Boxer M, Ellman L, Carvalho A. The lupus anticoagulant. *Arthritis Rheum* 1976; 19: 1244-8.
- 43.- Mueh JR, Herbst KD, Rapaport SI. Thrombosis in patients with the lupus anticoagulant. *Ann Intern Med* 1980; 92: 156-9.

- 44.- Boey ML, Colaco CB, Gharavi AE, et al. Thrombosis in systemic lupus erythematosus: Striking association with the presence of circulating lupus anticoagulant. *Br Med J* 1983; 287: 1021-3.
- 45.- Elias M, Eldor A. Thromboembolism in patients with the lupus type circulating anticoagulant. *Arch Intern Med* 1984; 144: 510-15.
- 46.- Thiagarajan P, Shapiro SS, DeMarco L. Monoclonal immunoglobulin M lamda coagulation inhibitor with phospholipid specificity. *J Clin Invest* 1980; 66: 397-405.
- 47.- Pengo V, Thiagarajan P, Shapiro SS, Heine MJ. Immunological specificity and mechanism of action of IgG lupus anticoagulants. *Blood* 1987; 70: 69-76.
- 48.- Galli M, Beguin S, Lindhout T, et al. Inhibition of phospholipid and platelet-dependent prothrombinase activity in the plasma of patients with lupus anticoagulant. *Br J Haematol* 1989; 72: 549-55.
- 49.- Gharavi AE, Harris EN, Asherson RS, et al. Anticardiolipin antibodies: Isotype distribution and phospholipid specificity. *Ann Rheum Dis* 1987; 46: 1-6.
- 50.- Costelo PB, Green FA. Binding affinity of serum immunoglobulin G to cardiolipin and other phospholipid in patients with systemic lupus erythematosus and syphilis. *Infection Immun* 1988; 56: 1738-42.
- 51.- Levy RA, Gharavi AE, Sammaritano LR, et al. Characteristics of IgG antiphospholipid antibodies in patients with SLE and syphilis. *J Rheumatol* 1990; 171: 1036-41.
- 52.- Gharavi AE, Harris EN, Lockshin MD, et al. IgG subclass and light chain distribution of anticardiolipin and anti-DNA antibodies in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 1988; 47: 286-90.
- 53.- Colaco CB, Male DK. Antiphospholipid antibodies in syphilis and a thrombotic subset of SLE: Distinct profiles of epitope specificity. *Clin Exp Immunol* 1985; 59: 449-56.

- 54.- Harris EN, Gharavi AE, Wasley GD, et al. Use of an enzyme-linked immunosorbent assay and of inhibition studies to distinguish between antibodies to cardiolipin from patients with syphilis or autoimmune disorders. *J Infect Dis* 1988; 157: 213-31.
- 55.- Harris EN, Gharavi AE, Hughes GRV. Antiphospholipid antibodies. *Clin Rheum Dis* 1985; 11: 591-609.
- 56.- Harris EN, Chan JK, Asherson RA, et al. Thrombosis, recurrent fetal loss and thrombocytopenia. Predictive value of the anticardiolipin antibody test. *Arch Intern Med* 1986; 146: 2153-6.
- 57.- Alving BM, Barr CF, Tang DB. Correlation between lupus anticoagulants and anticardiolipin antibodies in patients with prolonged activated partial thromboplastin time. *Am J Med* 1990; 88: 112-6.
- 58.- Lockshin MD, Druzin ML, Qamar T. Prednisone does not prevent recurrent fetal death in woman with antiphospholipid antibody. *Am J Obstet Gynecol* 1989; 169: 439-43.
- 59.- Eisenberg RA, Dyer K, Craven SY, et al. Subclass restriction and polyclonality of the systemic lupus erythematosus marker anti-Sm. *J Clin Invest* 1985; 75: 1270-7.
- 60.- Schur PH, Monroe M, Rothfield N. The subclass of antinuclear and antinucleic acid antibodies. *Arthritis Rheum* 1972; 15: 174-82.
- 61.- Rubin RL, Tang FL, Chang EK, et al. IgG subclasses of autoantibodies in systemic lupus erythematosus, Sjogren's syndrome, and drug-induced autoimmunity. *J Immunol* 1986; 137: 2528-34.
- 62.- Bonfa E, Llovet R, Elkon KD. Immunoblot analysis of IgG subclasses of multiple lupus antibodies. *J Immunol* 1988; 140: 2231-6.
- 63.- Aalberse RC, Van Der Gaag R, Van Leeuwen J. Serologic aspects of IgG4 antibodies. I. Prolonged immunization results in an IgG4-restricted response. *J Immunol* 130: 722-6.

- 64.- Rubin RL, Tang FL, Lucas AH, et al. IgG subclasses of anti-tetanus toxoid antibodies in adult and newborn normal subjects and in patients with systemic lupus erythematosus, Sjogren's syndrome, and drug-induced autoimmunity. *J Immunol* 1986; 137: 2522-7.
- 65.- Kioke T, Sueishi M, Funaki H, et al. Antiphospholipid antibodies and biological false positive serological test for syphilis in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol* 1984; 56: 193-9.
- 66.- Shoenfeld Y, Roach J, Massicotte H, et al. Polyspecificity of monoclonal lupus antibodies produced by human-human hybridomas. *N Engl J Med* 1983; 308: 414-20.
- 67.- Shoenfeld Y, Isenberg DA, Rauch J, et al. Idiotypic cross reactions of monoclonal human lupus autoantibodies. *J Exp Med* 1983; 158: 718-30.
- 68.- Eilat D, Zlotnick AY, Fischel R. Evaluation of the cross reaction between anti-DNA and anticardiolipin antibodies in SLE and experimental animals. *Clin Exp Immunol* 1986; 65: 269-78.
- 69.- Smeenk RJT, Lucassen WAM, Swaak TJG. Is anti-anticardiolipin activity a cross reaction of anti-DNA or a separate entity?. *Arthritis Rheum* 1987; 30: 607-17.
- 70.- Friguet B, Chaffotte AF, Djavadi-Ohainiance L, et al. Measurement of the true affinity constant in solution of antigen-antibody complexes by enzyme-linked immunosorbent assay. *J Immunol Meth* 1985; 77: 305-19.
- 71.- Harris EN, Gharavi AE, Loizou S, et al. Crossreactivity of antiphospholipid antibodies. *J Clin Lab Immunol* 1985; 16: 1-6.
- 72.- Staub HL, Harris EN, Khamashta MA, et al. Antibody to phosphatidylethanolamine in a patient with lupus anticoagulant and thrombosis. *Ann Rheum Dis* 1989; 48: 166-9.
- 73.- Mouritsen S, Hoier-Madsen M, Wiik A, et al. The specificity of anticardiolipin antibodies from syphilis patients and from patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol* 1989; 76: 178-83.

- 74.- Levy RA, Gharavi AE, Sammaritano LR, Habina L, Lockshin MD. Fatty acid chain is a critical epitope for antiphospholipid antibody. *J Clin Immunol* 1990; 10: 141-5.
- 75.- Pérez-Vazquez ME, Cabiedes J, Cabral AR, Alarcón-Segovia D. Fall in serum antiphospholipid antibodies levels upon development of nephrotic syndrome in systemic lupus erythematosus patients. Relationship to urinary loss of IgG and to other factors. *Am J Med* 1992; 92: 357-62.
- 76.- Alarcón-Segovia D, Osmundson PJ. Peripheral vascular syndrome associated with systemic lupus erythematosus. *Ann Intern Med* 1965; 62: 907-19.
- 77.- Alarcón-Segovia D, Delezé M, Oria CV, Sánchez Guerrero J, Gómez-Pacheco L, Cabiedes J, Fernández L, Ponce de León S. Antiphospholipid antibodies and the antiphospholipid syndrome in systemic lupus erythematosus. A prospective analysis of 500 consecutive patients. *Medicine (Balt)* 1989; 68: 53-365.
- 78.- Kamashta MA, Cervera R, Asherson RA, et al. Association of antibodies against phospholipid with heart valve disease in systemic lupus erythematosus. *Lancet* 1990; 335: 1541-4.
- 79.- Walz S, Kong HHP, Siver R. Adrenal failure and the primary phospholipid syndrome. *J Rheumatol* 1990; 17: 836-7.
- 80.- Sánchez-Guerrero J, Alarcón-Segovia D. Evolución clínica, tratamiento y causas de muerte en 23 pacientes con síndrome de antifosfolípido primario. (Abstract). *Rev Mex Reumatol* 1991; 6: 39.
- 81.- Ishii Y, Nagasawa K, Mayumi T, Niho Y. Clinical importance of persistence of anticardiolipin antibodies in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 1990; 49: 387-90.
- 82.- Colaco CB, Mackie IJ, Irving W, Machin SJ. Anticardiolipin antibodies in viral infections. *Lancet* 1989; 1: 622.

- 83.- Cohen AJ, Phillips TM, Kessler CM. Circulating coagulation inhibition in the acquired immunodeficiency syndrome. *Ann Intern Med* 1986; 104: 175-80.
- 84.- Gold JE, Haubenstock A, Zaluski R. Lupus anticoagulant and AIDS. *N Engl J Med* 1986; 314: 1252-3.
- 85.- Maclean C, Flegg FJ, Kilpatrick DC. Anticardiolipin antibodies and HIV infection. *Clin Exp Immunol* 1990; 81: 263-6.
- 86.- Canoso RT, Sise HS. Chlorpromazine induced lupus anticoagulant in chlorpromazine-patients. *Am J Haematol* 1982; 13: 121-9.
- 87.- Dubois EL, Tallman E, Wonka RA. Chlorpromazine induced systemic lupus erythematosus. case report and review of the literature. *J Am Med Assoc* 1972; 221: 595-6.
- 88.- Alarcón-segovia D, Fishbein E, Cetina JA, Raya RJ, Becerra E. Antigenic specificity of chlorpromazine-induced antinuclear antibodies. *Clin Exp Immunol* 1973; 15: 543-8.
- 89.- Korman AJ, Boss JM, Spies T, Sorrentino R, Okada K, Strominger JL. Genetic complexity and expression of human class II histocompatibility antigens. *Immunol Rev* 1985; 85: 45-86.
- 90.- Todd JA, Bell JI, McDevitt HO. HLA-DQ beta gene contributes to susceptibility and resistance to insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature* 1987; 329: 599-604.
- 91.- Savi M, Ferraccioli GF, Neri TM, Zanelli P, Dal'Aglio PP, Tincani A, Balestrieri G, Carella G, Cattaneo R. HLA-DR antigens and anticardiolipin antibodies in Northern Italian systemic lupus erythematosus patients. *Arthritis Rheum* 1988; 31: 1568-70.
- 92.- McHugh NJ, Maddison PJ. HLA-DR antigens and anticardiolipin antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1989; 32: 1623-4.
- 93.- Arnett FC, Olsen ML, Anderson KL, Reveille JD. Molecular analysis of major histocompatibility complex alleles associated with lupus anticoagulant. *J Clin Invest* 1991; 87: 1490-5.

- 94.- Asherson RA, Doherty DG, Vergani D, Khamashta MA, Hughes GRV. Major histocompatibility complex associations with primary antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheum* 1992; 35: 124-5.
- 95.- Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, Schaller JG, Talal N, Winchester RJ. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982; 25: 1272-7.
- 96.- Alarcón-Segovia D, Pérez-Vazquez ME, Villa A, Drenkard C, Cabeldes J. Characterization of, and preliminary criteria for, the antiphospholipid syndrome occurring within systemic lupus erythematosus. *Sem Art Rheum* 1992; 21: 275-86.
- 97.- Delezé M, Oria CV, Alarcón-Segovia D. Occurrence of both hemolytic anemia and thrombocytopenic purpura (Evan's syndrome) in systemic lupus erythematosus. relationship to antiphospholipid antibodies. *J Rheumatol* 1988; 15: 611-5.
- 98.- Boyum A. Isolation of leukocytes from human blood: further observations. *Scand J Clin Lab Invest (Suppl)* 1968; 97: 31.
- 99.- Terasaki PI, McClelland JD. Microdroplet assay of human serum cytotoxins. *Nature* 1964; 204: 998.
- 100.- Bodmer JG, Pickbourne P, Richards S. Ia Serology In: Bodmer WF, Batchelor JR, Bodmer JG, Festenstein H, Morris PJ, Editors: Histocompatibility testing 1977, *Munksgaard, Copenhagen, Denmark* 1978, p 612.
- 101.- Alper, CA., Boenisch, T., and Watson, L. (1972). Genetic polymorphism in human glycine-Rich beta glycoprotein. *J Exp Med* 135: 68.
- 102.- Miller S, Dykes D, Polesky H. A simple salting-out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16: 1215.

- 103.- Saiki RK, Sharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn G, Erlich HA, Arnheim N. Enzymic amplification of B-globin genome sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985; 230: 1350.
- 104.- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf S, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; 239: 487.
- 105.- Kessler C, Holtke HJ, Selbi R, Burg J, Muhlegger K. Non-radioactive labelling and detection of nucleic acids: I. A novel DNA labelling and detection system based on digoxigenin:anti-digoxigenin ELISA principle. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 1990; 371: 917-27.
- 106.- Wood WI, Gitschier J, Lasky LA, Lawn RM. Base composition-independent hybridization in tetramethyl-ammonium chloride: a method for oligonucleotide screening of highly complex gene libraries. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 1585-8.
- 107.- Celada A, Barras L, Benzonana G, Jeannet M. Increased frequency of HLA-DRw3 in systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens* 1980; 15: 283-8.
- 108.- Black CM, Welsh KI, Fielder A, Hughes GRV, Barchelor JR. HLA antigens and Bf allotypes in SLE: evidence for the association being with specific haplotypes. *Tissue Antigens* 1982; 19: 115-20.

X. TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Iniciadores usados en el presente estudio.

Iniciador	Especificidad	Secuencia *
DRBAMP-A	5'-DRB GENERICO	CCCCACAGCACGTTTCTT G
DRBAMP-B	3'-DRB GENERICO	CCGCTGCACTGTGAAGCT CT
DRBAMP-52	5'-DRB3	CCCAGCACGTTTCTTGGA GCT
DQBAMP-A	5'-DQB GENERICO	CATGTGCTACTTCACCAAC GG
DQBAMP-B	3'-DQB GENERICO	CTGGTAGTTGTGTCTGCAC AC

* La secuencias son las reportadas en el XI Taller Internacional de Histocompatibilidad (Yokohama, Japón).

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para la tipificación de los alelos DRB.

Oligonucleótido	Especificidad	Secuencia 5' a 3'
DRB1001	DR1 (DRB1*01)	TAAGTTTGAATGTCATT
DRB1004	DR4 (DRB1*04)	GAGCAGGTTAAACATGAG
DRB1006	DR7 (DRB1*07)	TGGCAGGGTAAGTATAAG
DRB1007	DR9 (DRB1*09)	GAAGCAGGATAAGTTTGA
DRB1008	DR10 (DRB1*10)	GAGGAGGTTAAGTTTGAG
DRB1009	DR2 (DRB5)	CAGCAGGATAAGTATGAG
DRB1010	DRw52 (DRB3*0101)	GAGCTGCGTAAGTCTGAG
DRB1011	DRw52 (DRB3*0201 + 0202 + 0301)	GAGCTGCTTAAGTCTGAG
DRB2803	DR7 (DRB1*07)	TGGAAAGACTCTTCTATA
DRB7011	DR2 (DRB1*02)	GACATCCTGGAGCAGGCG
DRB1003	DR3, DR11, DR13, DR14 DRB1*03, DRB1*11, DRB1*13, DRB1*14)	GTACTCTACGTCTGAGTG
DRB1005	DRw12, DRw8 DRB1*1201, DRB1*08)	AGAAATAACACTCACCCG
DRB2802	DRw12 (DRB1*1201)	GGTTACTGGAGAGACT
DRB2810	DRw53 (DRB4*0101)	GCGAGTGTGGAACCTGAT
DRB5703	DRw11 (DRB1*11)	GCCTGATGAGGAGTACTG

Unicamente se muestran 15 de las 21 sondas utilizadas.

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para la tipificación de los alelos DQB.

Oligonucleótido	Especificidad	Secuencia de 5' a 3'
DQB2301	DQB*0401	GACCGAGCTCGTGCGGG
DQB2302	DQB*03031 + 0402	GACCGAGCGCGTGCGGG
DQB2601	DQB*0501+0502+05031+05032	CGGGGTGTGACCAGACAC
DQB2602	DQB*0601+0301	CGTTATGTGACCAGATAC
DQB2604	DQB*0603+0604	CGTCTTGTAACCAGACAC
DQB2606	DQB*0605	CGTCTTGTAACCAGATAC
DQB3702	DQB*0601	AGGAGGACGTGCGCTTCG
DQB4501	DQB0301	GACGTGGAGGTGTACCG
DQB4901	DQB*0501	GGTGTACCGGGCAGTGAC
DQB5701	DQB*0501+0604+0605	GCGGCCTGTTGCCGAGTA
DQB5702	DQB*0502+0504	GCGGCCTAGCGCCGAGT
DQB5703	DQB*05031+0601	GGCGGCCTGACGCCGAG
DQB5705	DQB*0201	GGCTGCCTGCCGCCGAG
DQB5707	DQB*03032	GGCCGCCTGCCGCCGAG
DQB5708	DQB*0401+0402	GCGGCTTGACGCCGAGTA
DQB7002	DQB*0601	GACCCGAGCGGAGTTGG
DQB7003	DQB*0602+0603	GAGGGGACCCGGGCGGA

Únicamente se muestran 17 de las 36 sondas utilizadas.

Tabla 4. Distribución de aCL en pacientes con LEG, en pacientes con SaFP y en sus familiares.

	LEG				SaFP			
	Pacientes (n=80)		Familiares (n=378)		Pacientes (n=17)		Familiares (n=90)	
	n	%	n	%	n	%	n	%
aCL (+)	52	65	63	16.6	17	100	0	0
aCL (-)	28	35	315	83.3	0	000	90	100

Tabla 5. Frecuencias génicas (fg) de antígenos clase I y II en pacientes con LEG positivos para aCL, sus familiares positivos y sujetos control.

	Pacientes (n=104)*	Familiares (n=126)*	Controles (n=200)	P vs C	F vs C	P vs F
HLA-	fg	fg	fg	pC	pC	pC
A31	0.125	0.103	0.200	NS	NS	NS
A28	0.038	0.023	0.120	NS	0.02	NS
A3	0.125	0.111	0.065	NS	NS	NS
B7	0.115	0.103	0.060	NS	NS	NS
B39	0.076	0.023	0.150	NS	0.003	NS
B60	0.038	0.015	0.105	NS	0.03	NS
DR1	0.028	0.071	0.090	NS	NS	NS
DR2	0.163	0.142	0.075	NS	NS	NS
DR3	0.173	0.126	0.070	0.04	NS	NS
DR4	0.259	0.206	0.370	NS	0.008	NS
DR7	0.192	0.142	0.065	0.005	0.019**	NS
DRw52	0.355	0.285	0.400	NS	NS	NS
DRw53	0.451	0.341	0.460	NS	NS	NS
DQ1	0.269	0.301	0.220	NS	NS	NS
DQ2	0.269	0.246	0.125	0.003	0.001	NS
DQ3	0.461	0.301	0.600	NS	0.00001	NS

* Debido a que se analizan fg el valor de n muestra número de haplotipos en cada grupo.

52 pacientes (104 haplotipos)

63 familiares (126 haplotipos)

** pC no significativa.

pC: p corregida NS: valor de p no significativa.

Tabla 6. Frecuencias génicas (fg) de antígenos clase I y clase II en pacientes con LEG negativos para aCL y sujetos control.

	Pacientes (n=56)*	Controles (n=200)	pC	RR
HLA-	fg	fg		
A3	0.107	0.065	NS	---
A31	0.125	0.200	NS	---
A28	0.142	0.120	NS	---
B7	0.107	0.060	NS	---
B39	0.053	0.150	NS	---
B35	0.017	0.135	NS	---
B60	0.053	0.105	NS	---
DR1	0.089	0.090	NS	---
DR2	0.125	0.075	NS	---
DR3	0.178	0.070	0.013**	2.89
DR4	0.232	0.370	NS	---
DR5	0.071	0.110	NS	---
DR7	0.142	0.065	NS	---
DQ1	0.339	0.220	NS	---
DQ2	0.250	0.125	NS	2.33
DQ3	0.392	0.600	0.01	0.43

* 28 pacientes (56 haplotipos).

NS valor de p no significativo.

** pC no significativa.

Tabla 7. Frecuencias génicas (fg) de antígenos clase II (HLA-DR) en pacientes con anticoagulante lúpico inducido por el tratamiento con clorpromazina.

	Pacientes (n=82)	Controles (n=200)		
HLA-	fg	fg	pC	RR
DR1	0.060	0.100	NS	---
DR2	0.158	0.175	NS	---
DR3	0.134	0.130	NS	---
DR4	0.073	0.135	NS	---
DR5	0.158	0.165	NS	---
DR6	0.024	0.115	NS	---
DR7	0.280	0.125	0.008	2.73
DR8	0.012	0.030	NS	---

* p significativa después de corregir su valor.

pC p corregida.

Tabla 8. Correlación entre frecuencias génicas (fg) de antígenos clase II relevantes y el síndrome de antifosfolípido secundario a LEG.

	Definido (n=16)	Probable (n=28)	Dudoso (n=30)	Negativo (n=34)	Controles (n=200)
HLA	fg	fg	fg	fg	fg
DR1	0.062	0.071	0.000	0.029	0.090
DR2	0.187	0.178	0.133	0.029	0.075
DR3	0.062	0.142	0.266**	0.205	0.070
DR4	0.125	0.214	0.266	0.264	0.370
DR5	0.125	0.000	0.100	0.058	0.110
DR7	0.312**	0.214**	0.100	0.176	0.065
DQ2	0.437**	0.357**	0.366**	0.382**	0.125

- * 8 pacientes con síndrome definido (16 haplotipos)
 14 pacientes con síndrome probable (28 haplotipos)
 15 pacientes clasificados como dudosos (30 haplotipos)
 17 pacientes clasificados como negativos (34 haplotipos)
- ** p significativa después de corregir su valor.

Tabla 9. Frecuencias génicas (fg) de antígenos clase I y clase II en pacientes con SaFP, sus familiares en primer grado y sujetos control.

	Pacientes (n=34)*	Familiares (n=31)*	Controles (n=200)	Pt vs Ct	Fam vs Ct	Pt vs Fam
HLA-	fg	fg	fg	pC	pC	pC
A1	0.088	0.161	0.075	NS	NS	NS
A2	0.441	0.161	0.280	NS	NS	NS
A31	0.058	0.129	0.200	NS	NS	NS
B5	0.029	0.161	0.095	NS	NS	NS
B39	0.205	0.032	0.150	NS	NS	NS
B60	0.029	0.193	0.105	NS	NS	NS
DR1	0.029	0.161	0.090	NS	NS	NS
DR2	0.205	0.064	0.075	NS	NS	NS
DR3	0.088	0.032	0.070	NS	NS	NS
DR4	0.176	0.161	0.370	NS	NS	NS
DR5	0.352	0.193	0.110	0.001	NS	NS
DR7	0.000	0.161	0.065	NS	NS	0.02
DRw52	0.529	0.322	0.400	NS	NS	NS
DRw53	0.205	0.419	0.460	0.04	NS	NS
DQ1	0.352	0.354	0.220	NS	NS	NS
DQ2	0.058	0.290	0.125	NS	NS	NS
DQ3	0.588	0.322	0.600	NS	0.009	NS

* 17 pacientes (34 haplotipos).

90 familiares (31 haplotipos no heredados por los pacientes).

pC p corregida. NS valor de p no significativo.

Tabla 10. Estudio molecular en pacientes con SaFP.

	Pacientes *		Controles *		pC	RR
	(n=41)		(n=50)			
	n	%	n	%		
DRB1*01	1	2.3	3	6.0	NS	---
DRB1*02	7	16.6	3	6.0	NS	---
DRB1*03	3	7.1	4	8.0	NS	---
DRB1*04	8	19.0	15	30.0	NS	---
DRB1*11	4	9.5	4	8.0	NS	---
DRB1*1201	9	21.4	1	2.0	0.01	13.7
DRB1*07	0	0.0	3	6.0	NS	---
DRB1*08	6	14.2	7	14.0	NS	---
DRB1*09	1	2.3	0	0.0	NS	---
DRB1*10	2	4.7	1	2.0	NS	---
DQB*02	3	7.1	6	12.0	NS	---
DQB*05	6	14.2	4	8.0	NS	---
DQB*06	8	19.0	4	8.0	NS	---
DQB*0301	16	38.0	13	26.0	NS	---
DQB*0302	8	19.0	13	26.0	NS	---
DQB*0302	1	2.3	0	0.0	NS	---

* 21 pacientes (42 haplotipos).

25 controles (50 haplotipos)

pC p corregida.

NS valor de p no significativo.

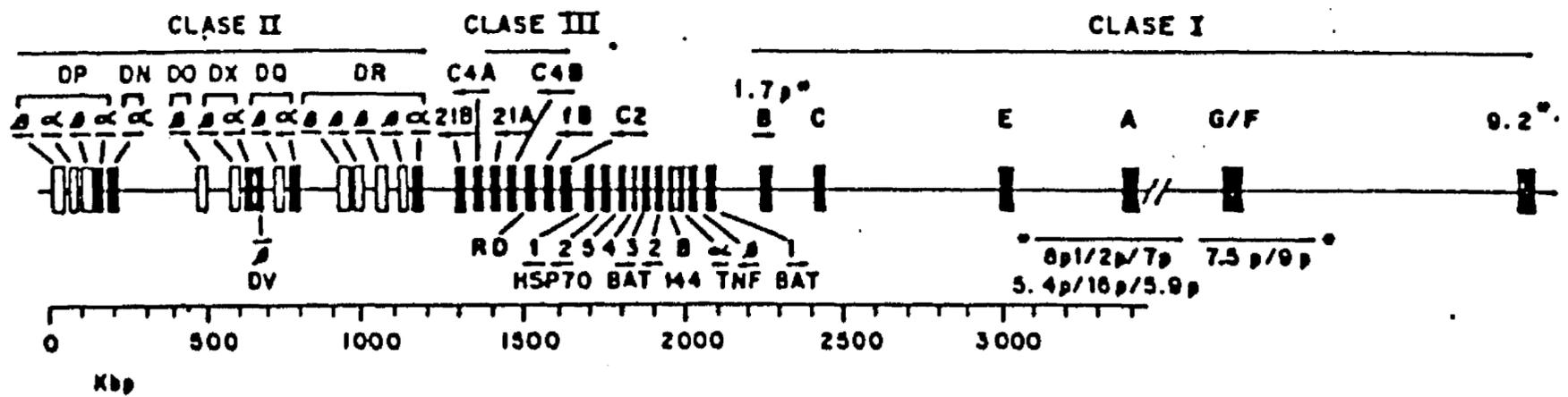
Tabla 11. Frecuencias génicas (fg) de antígenos relevantes (clase I y II) en pacientes con SaFP y pacientes con SaFS a LEG.

	SaFP (n=34)	LEG + SaFS (Definido + Probable) (n=44)		
HLA-	fg	fg	pC	RR
A1	0.088	0.159	NS	---
A2	0.441	0.181	NS	---
A31	0.117	0.090	NS	---
B39	0.205	0.022	NS	---
B60	0.029	0.022	NS	---
DR1	0.029	0.068	NS	---
DR2	0.205	0.181	NS	---
DR3	0.088	0.113	NS	---
DR4	0.176	0.250	NS	---
DR5	0.352	0.045	0.003	11.1
DR6	0.000	0.068	NS	---
DR7	0.000	0.250	0.007	ND
DRw52	0.529	0.250	NS	---
DRw53	0.205	0.500	0.05	0.26
DQ2	0.058	0.386	0.002	0.1
DQ3	0.588	0.295	0.02	3.4

* Para realizar este análisis se juntaron los grupos de pacientes clasificados como síndrome definido y probable, los cuales presentan tanto manifestaciones clínicas como positividad a aCL.

NS valor de p no significativo. ND valor no determinado.

Figura 1. Mapa Genético del Sistema Principal de Histocompatibilidad (SPH).



* Genes aún no clasificados. Se desconoce su función y localización exacta.

Figura 2. Marcadores asociados con la presencia del anticuerpo y los asociados con la enfermedad

