



00361
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO 13

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO 71.

"ESTUDIO INMUNOGENETICO EN MESTIZOS
MEXICANOS CON LEG"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS (BIOLOGIA)

P R E S E N T A

JOSE MARIO GAYTAN ALCOCER

DIRECTOR DE TESIS: DR. GUSTAVO ACOSTA ALTAMIRANO

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1997



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**ESTUDIO INMUNOGENÉTICO
EN MESTIZOS MEXICANOS
CON LEG**

**Facultad de Ciencias
UNAM**

TESIS

**Que presenta para la obtención del grado de
Maestro en Ciencias**

MARIO GAYTAN ALCOCER

1997

INDICE

RELACIÓN DE TABLAS	I
TABLA DE ABREVIATURAS	II
RESUMEN	III
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVO	22
MATERIALES Y MÉTODOS	22
RESULTADOS	28
DISCUSIÓN	36
CONCLUSIONES	38
BIBLIOGRAFÍA	39
AGRADECIMIENTOS	43

RELACIÓN DE TABLAS

Tabla 0	Frecuencia de Segregación de los Genes Clase I en algunos individuos con LEG	7
Tabla I	Frecuencia de los Antígenos de HLA Clase I en Pacientes con LEG	14
Tabla II	Frecuencia de los Antígenos del HLA Clase II en Pacientes con LEG	15
Tabla III	Comparación de Antígenos del HLA con el Autoanticuerpo Anti-SM en Pacientes con LEG	16
Tabla IV	Asociaciones Significativas entre Antígenos del HLA Clase I y el Autoanticuerpo Anti-SM	17
Tabla V	Frecuencia de Complotipos (57 Pacientes)	31
Tabla VI	Frecuencia Fenotípica de Antígenos del HLA Clase I en 85 Individuos Sanos	32
Tabla VII	Frecuencia Fenotípica de Antígenos del HLA Clase II en 85 Individuos Sanos	33
Tabla VIII	Comparación de Frecuencia de los Antígenos del HLA Clase I en Pacientes con LEG y en individuos sanos	34
Tabla IX	Comparación de Frecuencia de los Antígenos del HLA Clase I en Pacientes con LEG y en Individuos Sanos	35
Tabla X	Asociaciones del HLA Alelos Clase II y Aminoácidos de la Cadena Externa con Autoanticuerpos Específicos en Lupus Eritematoso Generalizado	19

Tabla de Abreviaturas

Anti-SM	Autoanticuerpo contra el antígeno SM
HLA	Antígeno de histocompatibilidad
La	Antígeno presente en Células humanas
LEG	Lupus eritematoso generalizado
Ro	Antígeno presente en células humanas
Sm	Antígeno presente en células humanas
SPH	Sistema principal de histocompatibilidad
UI-RNP	Antígeno presente en células humanas

RESUMEN

Se estudiaron 68 mestizos mexicanos con LEG para cuantificar por análisis inmunoenzimático los niveles del autoanticuerpo Anti-Sm y a 57 de estas personas se les tipificaron los antígenos de histocompatibilidad (HLA) mediante la técnica de microlinfotoxicidad. Con el objeto de conocer si existe asociación de la presencia de Anti-Sm con los HLA, éstos se compararon con los antígenos de la población mestiza mexicana sana. Además de determinar la frecuencia del Anti-Sm en mestizos mexicanos con LEG. Los resultados mostraron asociaciones positivas significativas del Anti-Sm con el HLA-A9 (p menor de 0.03), el HLA-B7 (p menor de 0.04) y el B27 (p menor de 0.01) y asociación negativa con el HLA-B14 (p menor de 0.003). También se observó, aunque no de manera significativa, la asociación del HLA-DR2 con la producción del Anti-Sm. La diferencia del HLA en sujetos con LEG y los sanos fueron el HLA-C1, C4 y C6 con mayor frecuencia en los primeros y el HLA-B12 y B16 en los segundos. La frecuencia del anti-Sm fue de 49% en el LEG. Estos datos sugieren que el gen relevante en la producción del Anti-Sm está localizado entre el locus HLA-B y HLA-DR. La frecuencia de positividad para el anticuerpo Anti-Sm así como su asociación con los antígenos del HLA difiere de lo reportado en otros grupos étnicos, infiriendo la existencia de diferencias sustanciales en la genética poblacional de las diferentes etnias.

I. Introducción

En la actualidad el reumatismo puede definirse con un término genérico que comprende todas aquellas causas de dolor o rigidez del sistema músculo-esquelético. Otros términos utilizados frecuentemente son: enfermedades reumatológicas sistémicas como el lupus eritematoso generalizado (LEG), artritis reumatoide (AR), esclerodermia y enfermedad mixta del tejido conjuntivo (EMTC).

De las enfermedades mencionadas el LEG ha sido conocido desde las 3 últimas décadas como una enfermedad reumática muy importante, siendo una de las más comunes del tejido conjuntivo en algunos países incluyendo a México. La primera descripción original del LEG la hizo Biett en 1822 y en 1851 Cazanave uso por primera vez el nombre lupus eritematoso para describir las manifestaciones cutáneas de la enfermedad. El término lupus que literalmente significa "lobo" en latín, se usó para denotar la naturaleza destructiva del lupus vulgar.

La prevalencia que se ha informado del LEG es variable. A nivel mundial va desde 1.9 por 100 000 habitantes hasta 400 por 100 000 habitantes. Cerca de un 90% se presenta en mujeres y varía de acuerdo a la raza. Algunos estudios reportan una prevalencia de cerca de 1 sobre 1000 en mujeres blancas y de 250 sobre 1000 en mujeres negras Fessel WJ (1974), pero los estudios más recientes realizados en Rochester, Minnesota arrojan un resultado de 53.8 por 100 000 en el sexo femenino Micht CJ y cols. (1985), Lisker R y cols. (1990).

En México no se conoce con precisión la prevalencia, pero ésta será proporcional de acuerdo al grado y predominio de raza indígena en el

mestizaje. Varios estudios realizados en la Ciudad de México, Puebla, Oaxaca, Saltillo entre otros, reportan un predominio en el mestizaje de la raza indígena que va desde el 51% a 56%, seguida por la raza blanca en un 33 al 40% y por último la raza negra que su proporción es del 1 al 10.7% Lisker y cols (1986), Alarcón-Segovia (1984) y Tan EM (1982) .

Dentro de su patogenia, el LEG parece ser un trastorno de la regulación inmunológica que ocasiona una pérdida de la tolerancia, esto da como resultado reacciones autoinmunes contra antígenos del huésped, esta alteración inmunológica podría originarse por varios mecanismos como son: la disminución de respuesta a la interleucina-2, una función defectuosa de células asesinas y el principal efecto clínico de esta alteración es una linfopenia con disminución de las células T, específicamente en el subgrupo TH4 de los linfocitos CD4 cooperadores cuya función es estimular e inducir a las células TCD8 que actúan como células T supresoras, incluyendo a la síntesis de anticuerpos, por lo tanto puede ocasionar una presencia excesiva de las células B, dando como resultado una gran cantidad de anticuerpos.

Los sujetos con LEG generan una gran diversidad de autoanticuerpos a varios componentes celulares los que se clasifican de acuerdo a su reactividad en 3 grupos: a) Los dirigidos contra componentes de la cromatina b) los dirigidos contra complejos de ribonucleoproteínas y el c) los que están dirigidos contra componentes nucleares de las mitocondrias.

Durante los últimos años se han dedicado muchos esfuerzos a la identificación y caracterización de autoanticuerpos contra los diferentes antígenos. Los primeros antígenos intracelulares identificados fueron el anti-DNA e histonas que están contenidos en la cromatina, la cual está formada por la asociación de DNA y proteínas llamadas histonas a cuyo conjunto se denomina nucleosoma.

Otro componente celular que contiene antígenos nucleares muy importantes es el nucleolo, representando las más complejas y grandes estructuras de ribonucleoproteínas dentro del núcleo. Estas últimas están constituidas por moléculas de RNA de bajo peso molecular por lo que se les denomina ribonucleoproteínas nucleares pequeñas o RNPnp. Cuando residen en el citoplasma se les denomina ribonucleoproteínas citoplasmáticas o RNPcp. En todos los casos estudiados, se han encontrado RNAs asociados no covalentemente con proteínas para formar ribonucleoproteínas (RNPs). Hay cuatro autoanticuerpos hacia RNPs que se presentan frecuentemente en pacientes con LEG y cuyas siglas son: Sm, U1-RNP, Ro y La. A este grupo de ribonucleoproteínas se les denomina antígenos extraídos del núcleo o ENA. De estos antígenos se ha demostrado que el Sm y el U1-RNP residen en el núcleo y contienen diferentes variedades de RNAs (U1, U2, y U4-U6). Los RNPnp son reconocidas por anti-Sm y tienen papeles preponderantes en la conversión del RNA_h (nuclear heterogéneo) en RNA mensajero maduro. El RNA_h en su forma de transcripción inicial está constituido por segmentos codificadores llamados exones interrumpidos por segmentos sin sentido (que no codifican) llamados intrones. Es aquí donde intervienen los RNPnp U1, U2, U4-U6 y U5 ayudando a la escisión de los intrones para formar el RNA mensajero maduro.

En el LEG también se desarrollan anticuerpos contra diversas células como los eritrocitos, plaquetas o linfocitos.

Las alteraciones inmunológicas descritas son producidas por la interacción de factores genéticos, hormonales y ambientales.

La ocurrencia de casos familiares de LEG, al igual que otras enfermedades autoinmunes que se agregan dentro de una misma familia, así como la alta concordancia en gemelos homocigóticos y el aumento de

presentación en familiares de primer grado con la enfermedad sugieren un fondo genético en su patogenia. También se sabe que puede haber autoanticuerpos y disminución de la función de las células supresoras en familiares consanguíneos de pacientes con LEG. Los factores genéticos también se infieren por los diversos porcentajes de incidencia del LEG en determinadas razas. Aunado a lo anterior, se ha encontrado cierta relación entre LEG y algunos marcadores genéticos del sistema principal de histocompatibilidad, particularmente con los antígenos del HLA.

En cuanto a los factores ambientales, se ha encontrado la presencia de autoanticuerpos en familiares consanguíneos y no consanguíneos pero con habitat compartido con los pacientes con LEG, además de presentarse en personal de laboratorio que está en contacto con sueros de estos pacientes. Esto ha motivado a pensar en un posible factor etiológico viral que contribuya a la patogénesis del LEG. Se considera que, otros factores ambientales, también participan en la patogénesis del LEG como ejemplo: la luz solar, las quemaduras térmicas y otros factores físicos.

El hecho de que la mayoría de los individuos con LEG son mujeres, permite pensar en algún papel etiológico hormonal. Además se ha reportado un incremento en los niveles de hidroxilación del carbono 16 de la estrona, lo que resulta en niveles aumentados de 16 alfa-hidroxiestrona y estriol tanto en mujeres como en hombres, con disminución de la hidroxilación en C-2 de la estrona que causa niveles menores de 2-hidroxiestrona y 2-metoxiestrona en mujeres con LEG. Estas alteraciones pueden dar lugar a un aumento en la producción de autoanticuerpos.

2. Sistema Principal de Histocompatibilidad

El sistema principal de histocompatibilidad (SPH) es un conjunto de genes que se encuentran en el brazo corto del cromosoma seis del humano. Abarca entre tres mil y cuatro mil pares de bases nucleotídicas e incluye a los genes de HLA (Antígenos Leucocitarios Humanos). Los HLA tiene como principal función distinguir entre antígenos contra los cuales sería benéfica la respuesta inmunitaria de aquellos contra los cuales sería nociva. En otras palabras, deben regular la respuesta inmune distinguiendo entre lo propio y lo extraño. Además participan en la compatibilidad materno fetal, componentes del sistema del complemento y quizás en funciones relacionadas en general con la regulación de interacciones célula-célula.

El reconocimiento de lo propio y lo extraño es claro que se realiza a través de la identificación de los antígenos por las células T, siempre y cuando la clase de HLA estén unidas a los linfocitos CD4 o CD8.

Se distinguen 3 clases de genes en la región de HLA, llamados clase I, II, y III

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

El orden de los genes dentro del cromosoma 6 desde el centrómero hasta el telómero es: clase II (antígenos DRw, DQ y DR), clase III (complemento, 21-hidroxilasa, factor B), clase I (antígenos B,C,A).

El sistema HLA es el más polimórfico de todo el genoma humano. Hasta la fecha se han definido por serología al menos 24 antígenos para el locus HLA-A. 50 para el B y se cree que la genética molecular deberá encontrar

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

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

En el SPH la frecuencia de recombinación génica es muy baja (menor al 2%), la fracción de recombinación entre los loci A (clase I) y B es de 0.010, entre el B y el C es de 0.001, y entre los loci C y A es de 0.007. Esto se debe a que este conjunto de genes ocupa solamente unas 3800 kilobases brazo corto del cromosoma 6. El entrecruzamiento entre cromosomas homólogos que de modo natural ocurre durante la meiosis, que incluya a los genes del HLA-A y B o HLA-B y DR ocurre con una frecuencia un poco menor al 1% del total de ellas. Por esta razón este complejo génico puede considerarse como una sola unidad genética y de hecho se hereda como tal. A dicha unidad se le conoce como haplotipo, ya que se transmite a través de las células haploides. Así, los alelos de los loci del SPH de un cromosoma en particular constituyen un haplotipo (el genotipo de un individuo está formado por 2 haplotipos, uno de origen paterno y otro del materno). Una combinación dada de alelos de los loci FB, C2, C4A y C4B forman el haplotipo de los genes del complemento, llamado también complotipo.

3. Función del SPH.

Clase I.

La región de clase I del SPH se encuentra hacia el telómero. Tiene al menos 17 genes relacionados entre sí, los más conocidos son los loci HLA-A, B y C (11).

Los genes de clase I mejor caracterizados son : HLA - A,B,C,F,G.
Son muy polimórficos y su polimorfismo es mayor que el de las regiones variables de las inmunoglobinas. La mayoría de las posiciones polimórficas se encuentran en los residuos 1 al 194.

Tabla 0
Frecuencia de Segregación de los genes Clase I
en algunos individuos con LEC

Genes	Clase I	Frecuencia
HLA-A2,	B15, C4	0.070
HLA-A1,	B7, C1	0.020
HLA-A2,	B14, C3	0.010
HLA-A2,	B35, C6	0.030

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

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

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

La estructura de los antígenos de clase I se dedujo a partir de la determinación de la secuencia de aminoácidos de material purificado de una línea celular humana linfoblastoide. Estas moléculas tienen dominios extracelulares, una región transmembranal y otra citoplasmática corta. Mediante cristalografía de rayos X se ha podido determinar la estructura tridimensional de la molécula HLA-A2.

La cadena pesada alfa consta de 3 dominios externos (alfa 1, 2 y 3). Los dominios más distales de la membrana celular son los alfa 1 y 2, están doblados en una estructura plana beta-plegada y están unidos por 2 alfa-hélices, y son los que contienen los residuos polimórficos. Estos 3 dominios conforman el sitio de unión al antígeno y es de esta forma como es presentado por la molécula del HLA al receptor del linfocito T.

El dominio de alfa 3 y la beta-2-microglobulina están relacionados estructuralmente a los dominios de las inmunoglobulinas y posiblemente interactúan entre sí.

Clase II.

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

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

Los antígenos de clase II son los determinantes primarios en la generación de respuestas proliferativas de los linfocitos T en cultivo mixto de linfocitos. Están constituidos por 2 cadenas glicoproteicas, unidas no covalentemente, una pesada alfa monomérica de 33 kd y una ligera beta polimérica de 28 kd, ambas codificadas por loci del HLA.

La molécula de clase II tiene cuatro dominios externos (alfa 1, 2, beta 1 y 2), análogos a los dominios alfa 1,3 y 2, con beta2-microglobulina, de la molécula de clase I respectivamente. Los dominios alfa 2 y beta 2 son del tipo de los dominios constantes de las inmunoglobulinas, muy conservados y los dominios alfa 1 y beta 1 son polimórficos.

Se ha propuesto un modelo para explicar su estructura tridimensional que es parecida a la de la estructura de la molécula de clase I.

La molécula de clase II tiene asociada a las cadenas alfa y beta glicoproteína transmembranal de 31 kd, que se conoce como cadena teta y/o cadena invariante. Esta cadena no se detecta con anticuerpos en la superficie celular y por esto se piensa que se disocia del complejo entre el paso por el aparato de Golgi y el arribo a la membrana celular.

De las tres subregiones de los genes de clase II la subregión DP consta de 2 pares de loci alfa y 2 beta, de los cuales DP alfa 2 y DP beta2 parecen ser pseudogenes. La subregión DR tiene 2 genes beta (el beta 1 codifica para las variantes de DR del DR1 al DR18), el beta 2 es un pseudogene, el beta 3 codifica para el determinante DRw52 y el beta 4 para el determinante DRw53. Hay un gen DR alfa no pleomórfico.

Se expresan 3 tipos de productos de clase II (DP, DQ y DR). Pueden formarse pares de cadenas DQw alfa y DQw beta en trans; es decir, la cadena alfa y beta 1 codificadas cada una por uno de los 2 cromosomas homólogos de un individuo. También se pueden combinar productos de los diferentes loci, como DR alfa y DQw beta en ratones transfectados (Guizar V. y cols, 1991)

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

El polimorfismo alélico de los antígenos de clase I y II se reconoce fenotípicamente por serología. Las variantes del HLA-Dw se detectan por cultivo mixto de linfocitos. El polimorfismo genotípico se reconoce mediante secuenciación de nucleótidos y análisis de fragmentos de restricción.

Clase III.

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

Los genes de clase III del SPH, después del HLA-B, forman el conjunto de marcadores genéticos más polimórficos del genoma humano. Los 4 loci de esta región (C2, factor B, C4A y C4B) se heredan en bloque. Las moléculas de C2 y del factor B son glicoproteínas de una sola cadena con pesos moleculares de 102 Kd y 90 Kd daltones respectivamente, y circulan en el plasma en forma de proenzimas.

Se sintetizan en el hígado y en células de la línea monocito-macrófago parecen tener tres dominios globulares. La molécula de C4 es de 200 kd y tiene tres subunidades unidas por puentes disulfuro, alfa (95 kd) y (30kd). Se sintetiza como una sola cadena en el orden beta-alfa-teta, que luego es glicosilada y se procesa intracelularmente, se secreta como una estructura de tres cadenas.

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

El gene del FB tiene 18 exones, caso semejante al del gene del C2. La organización de sus exones tiene semejanza estructural y evolutiva con otras proteasas de serina. Existen 2 variantes principales de FB, detectadas por medio de electroforesis del plasma, en gel de agarosa, más inmunofijación, tiene dos variantes (alelos) comunes: F y S, hay , además 2 variantes raras, F1 y S1. Las variantes de C2 se pueden detectar mediante isoelectroenfoque del plasma o suero y un ensayo hemolítico normal.

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

Hay 2 loci para C4 en el humano. Producen proteínas similares que difieren serológica, estructural y funcionalmente entre sí. El polimorfismo estructural de C4 es mayor que el de C2 o FB y es el que proporciona el

polimorfismo de los complotipos, los alelos de cada locus de C4 se designan con números según la movilidad electroforética del cátodo al ánodo.

El nombre de un alelo está dado por : Nombre del locus, un asterisco y un número o el símbolo "QO" si el alelo es nulo.

Existen alelos nulos de C4A y C4B. Alrededor de la mitad resultan de pérdidas del DNA que incluyen a C4A y 21-OHA o a C4B y 21-OHB. Los alelos nulos que no se deben a pérdidas del DNA probablemente resultan de varios defectos en la transcripción o la traducción.

Los 2 loci de la 21-hidroxilasa, 21-OHA y 21-OHB, se encuentran en dirección 3 junto a los loci de C4A y C4B, respectivamente. Se ha sugerido que los genes de la 21-hidroxilasa se duplicaron junto con los genes de C4. Sólo el locus 21-OHB es importante para la biogénesis de esteroides ya que la 21-OHA es un pseudogen.

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

4. Desequilibrio de Unión y Haplotipos Extendidos

La frecuencia de los diferentes antígenos y haplotipos del SPH varía de una población a otra y algunos de ellos son característicos de ciertos grupos étnicos. Pueden existir alelos de 2 ó más loci que se encuentran juntos con una frecuencia mayor a la esperada que si su asociación ocurriera al azar. A este fenómeno se le llama desequilibrio de ligamento o de unión y se presenta en el SPH. Esta es una característica del sistema HLA en todas las poblaciones estudiadas y es el fenómeno generalmente responsable de los haplotipos más frecuentes (Guízar V. y cols, 1991)

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

Asociaciones de Autoanticuerpos con el HLA en Lupus Eritematoso Generalizado

El LEG está caracterizado por una gran cantidad de autoanticuerpos, el desarrollo de las pruebas de serología en sujetos con LEG es reciente. Existen varias características que correlacionan con ciertos autoanticuerpos y en algunos casos es posible la participación directa de los autoanticuerpos en la patogénesis de las manifestaciones patológicas. Además, desde que se descubrió la participación de moléculas de HLA en la respuesta inmune antígeno específica dependiente de células T, se ha buscado una correlación entre alelos de HLA y LEG, ver (Tabla O, I, II, III y IV).

TABLA I. FRECUENCIA DE LOS ANTIGENOS DEL HLA CLASE I EN PACIENTES CON LEG

CLASE I		
ANTIGENO	N	FRECUENCIA
A2	35	0.614
A9	17	0.298
A3	10	0.175
A28	10	0.175
A19	9	0.157
A1	7	0.122
A11	6	0.105
A10	4	0.070
AX	16	0.280
B35	12	0.210
B14	11	0.192
B5	10	0.175
B7	10	0.175
B16	6	0.105
B27	6	0.105
B15	5	0.087
B8	4	0.070
B18	4	0.070
B40	4	0.070
B21	3	0.052
B22	3	0.052
B62	3	0.052
B12	2	0.035
BW35	2	0.035
B45	2	0.035
B49	2	0.035
B41	1	0.017
BX	24	0.421
C6	8	0.140
C4	8	0.140
C1	7	0.122
C3	6	0.105
C2	5	0.087
C5	4	0.070
C8	3	0.052
CX	17	0.298

TABLA II. FRECUENCIA DE LOS ANTIGENOS DEL HLA CLASE II EN
PACIENTES CON LEG

CLASE II		
ANTIGENO	N	FRECUENCIA
DR4	27	0.473
DR3	19	0.333
DR7	19	0.333
DR2	15	0.263
DR1	9	0.157
DR6	8	0.140
DR5	7	0.122
DR8	6	0.105
DRX	4	0.070
DQw3	38	0.668
DQw2	27	0.473
DQw1	31	0.543
DQwX	3	0.520
DRw53	39	0.684
DRw52	31	0.543
DRwX	13	0.228

TABLA III. COMPARACION DE ANTIGENOS DEL HLA CON EL AUTOANTICUERPO ANTI-SM EN PACIENTES CON LEG

ANTIGENO	ANTICUERPO ANTI-SM			
	POSITIVO		NEGATIVO	
	N	%	N	%
A2	15	26	20	35
A9	12	21	5	8.7
A3	4	7	6	10.5
A19	2	3.5	7	12.2
A28	7	12.2	3	5.2
A11	2	3.5	4	7
A25	2	3.5		0
A34	1	1.7	1	1.7
B14	1	1.7	10	17.5
B7	8	14	2	3.5
B27	6	10.5		0
B16	2	3.5	4	7
B8	1	1.7	3	5.2
B40	1	1.7	3	5.2
B12	2	3.5		0
B35	6	10.5	6	10.5
B41	1	1.7		0
Cw4	2	3.5	6	10.5
Cw1	2	3.5	5	8.7
Cw3	2	3.5	4	7
Cw5		0	2	3.5
DR2	10	17.5	5	8.7
DR1	3	5.2	6	10.5
DR6	3	5.2	5	8.7
DR5	5	8.7	2	3.5
DR8	4	7	2	3.5
DR4	12	21	15	26
DQw3	21	36	22	38
DRw52	21	36	22	38

TABLA IV. ASOCIACIONES SIGNIFICATIVAS ENTRE ANTIGENOS DEL HLA CLASE I Y EL AUTOANTICUERPO ANTI-SM.

Ag HLA			
HLA - Ac	Ac+	Ac-	VALOR DE P
			IC 95%
A9	12	5	0.03
B7	8	2	0.04
B27	6	0	0.01
B14*	1	10	0.003

Ac+ Anticuerpo positivo.

Ac- Anticuerpo negativo.

*** Existe una asociación negativa.**

Anticuerpos Anti-DNA de Doble Cadena

Los anticuerpos anti-DNAds se hallaron en un 40 al 60% de los individuos con LEG, son altamente específicos para la enfermedad y también se correlacionan con la producción de glomerulonefritis y hallazgos de complejos inmunes en la lesión glomerular.

Tan E.M. (1982) y Green y cols. (1986), describieron una fuerte correlación de HLA-DR3 con anticuerpos para Anti-DNAds. Altman D.M. y cols. (1991), y Alverellos y cols.(1983). informaron altos niveles de anti-DNAds asociados con HLA-DR2 y con DQw1. También notaron el incremento en la en la asociación de HLA-DR7 con pacientes positivos para anti-DNA.

En un estudio reciente de 126 pacientes con LEG, los alelos de clase II de HLA fueron determinados por oligonucleotidos. Galeazi y cols. (1992), informaron una fuerte asociación entre anti-DNAds y ciertos alelos de HLA-DQB. HLA-DQB*0201 (vinculados con DR3 y DR7), DQB1*0602 (unidos DR2 y DRw6) y DQB1 0302 (unidos con algunos haplotipos HLA-DR4) y con un porcentaje del 96% de los pacientes que tenían altos niveles de anticuerpos anti-DNAds.

Ninguno de los alelos HLA-DQ estuvieron asociados con nefritis. Aunque los anticuerpos anti-DNAds estuvieron relacionados significativamente con complicación renal, se encontró que el HLA-DQB1*0201 se correlacionó consistentemente con la presencia de anti-DNAds de pacientes que no desarrollaron enfermedad renal. Los alelos HLADQB1*0502 (AZH), y DQw6 (DQB1 0501 y 0503) fueron reportados por Fujisaku A. (1990) aumentados en pacientes con nefritis lúpica. En otros estudios Olsen M.L. y cols. (1993), encontraron un incremento en la frecuencia

de HLA-DQB1*0502 (AZ11) en pacientes griegos con LEG y anti-DNAs, siendo éstos muy frecuentes en esta población.

Los alelos HLA-DQB (0201, 0602 y 0302) asociados con anticuerpos anti-DNAs, reportados por Hamilton y cols. (1988), tienen en común poseer metionina en posición 14 y leucina en posición 26 del dominio y, esto representa un reforzamiento de los residuos críticos para esta respuesta inmune.

TABLA X Asociaciones del HLA alelos Clase II y aminoácidos de la cadena externa con autoanticuerpos específicos en lupus eritematoso generalizado.

AUTOANTI-CUERPOS DEL HLA	ASOCIACIONES CON HLA	ASOCIACIONES CON ALELOS DEL HLA	PROPUESTA DE RESIDUOS DE AAs DENTRO
Anti-DNA _d	DR3, DR2	DQB1*0201,0602 y 0302.	DQB metionina 14 y leucina 26.
Anti-Sm	Ninguno	DQwe(DQB1 0602 y/o DQA1 0102)	Noseconoce
Anti-RNPn(U1-RNP)	DR4	DQw5, DQw8	Noseconoce.
Antifosfolipidos	DR4, DR7	DQw7 (DQB1 0301), DQw8 (0302), DQw9 (0303) y DQwe (0602)	DQB posiciones 71-77
Anti-EBA Prolagena 7	DR2	DR2	Noseconoce
Anti-Ro (SSA)	DR3, DR2 DCw1/DQw2	DQA1*0501, 0101-0104,0402, DQB1 0201, 0601, 0604 y 0302	DQalfa1 glutamina 34, DQB1 leucina 26

Anticuerpos Anti-Sm y RNPn.

Los anticuerpos para las ribonucleoproteínas nucleares pequeñas (RNPsn) involucradas en conjunto con el RNAm, ocurren con frecuencia en pacientes con LEG, especialmente de raza negra. Los anticuerpos anti-Sm están dirigidos contra U1, U2, U4, U5 y U6 snRNPs y son altamente específicos para el LEG. El anti-RNPn (U1-RNP) a menudo acompaña al anti-Sm en pacientes con LEG, pero frecuentemente estos se encuentran sin que esté presente el anti-Sm, como es el caso de la enfermedad mixta del tejido conectivo, esclerodermia y polimiositis. En algunas series de pacientes con LEG, los anti-Sm y anti-RNPn, especialmente este último, está correlacionado con el fenómeno de Raynaud's, miositis y con miocarditis.

La asociación previa de HLA con anti-Sm y RNPn basada sobre serología de tipo de HLA, es débil. Olsen y cols. (1993), encontraron correlación de anti-Sm con HLA-DR7. Bell D.A. y cols. (1980) y Ahearn y cols. (1983) no encontraron correlación con anti-Sm o RNP y Hamilton y cols. (1988), notaron solamente una correlación negativa con algunos antígenos HLA en estado heterocigótico; por ejemplo: HLA-DQw1/DQw2. Lulli P. y cols., (1991) encontraron un incremento en la frecuencia de HLA-DR4 en pacientes blancos con LEG y con anti-Sm o RNP y reportaron un exceso de HLA-DQw3 en pacientes japoneses con Anti-RNP. Hooberg M.C. y cols., (1987) recientemente encontraron HLA-DR4 como más común en pacientes con enfermedad mixta del tejido conectivo que en LEG.

Olsen y cols (1991) usaron oligonucleótidos en americanos blancos y negros encontrando una correlación de anti-Sm (con o sin RNP) con HLA-DR2. En contraste la frecuencia del subtipo HLA-DQw6 estuvo

significativamente disminuida en pacientes con LEG teniendo anti-RNPn y sin anti-Sm. Lulli P. y cols. (1986), demostraron en pacientes italianos una asociación de anti-Sm con DQw2 y DR3. Gómez Reino y cols., (1991) llegaron a la misma asociación con el HLA-DR3 en pacientes españoles con LEG pero sin enfermedad renal. Green y cols (1986), informaron una alta asociación del anti-Sm con el HLA-DQA1*01002 y DQB1*0602. Por último, Olsen y cols. (1991), notaron aumento en la frecuencia de anti-Sm con HLA-DR2 y DQw6 asociado a DQA1 0102 en pacientes de la raza negra.

Anticuerpos Anti-Ro (SSA) y La (SSB).

La unión de anti-Ro y anti-La se presenta comúnmente en LEG y se presenta más en Sjogren's que en LEG. Bell y Maddison (1980) reportaron primeramente una alta frecuencia de HLA-DR3 y HLA-BS en pacientes blancos con LEG, pero también demostraron un incremento en frecuencia de HLA-DQw2. La presencia de anti-Ro, está también correlacionado con el complejo sicca, hiperglobulinemia y presencia de factor reumatoide en pacientes con LEG. Hamilton y cols., (1988) primero demostraron la asociación de anti-Ro y anti-La en pacientes de edad avanzada. Hamilton y cols., (1988) y Hochberg y cols. (1987), mostraron que el anti-Ro se correlaciona con HLA-DR3, sobre todo en pacientes con inicio temprano del LEG. Esta asociación de anti-Ro y anti-La fué confirmada en pacientes caucásicos europeos .

El Síndrome de Sjogren's puede ocurrir de manera secundaria al LEG, también puede existir como síndrome primario. Comparte algunas características clínicas y serológicas con el LEG. Los anticuerpos anti-Ro y anti-La aparecen en ambas enfermedades y parecen tener la misma asociación con

el HLA. En el síndrome primario de Sjogren's se demostró las asociaciones significativas de HLA-B8 y Dw3, posteriormente Fujisaku A. y cols.(1990) demostraron una fuerte asociación de HLA-DR3 con el Síndrome Primario de Sjogren's.

Basados en las anteriores citas bibliográficas este trabajo pretende conocer la relación que pudiera existir entre los marcadores genéticos del SPH en sujetos mestizos mexicanos con lupus eritematoso generalizado y la producción de anticuerpos anti-Sm.

Objetivo

Analizar las posibles asociaciones en mestizos mexicanos con LEG, entre genes del SPH y la producción de el autoanticuerpo anti-Sm, junto con la frecuencia que este anticuerpo presenta en mestizos mexicanos con LEG.

Materiales y Métodos

Se estudiaron 68 mestizos mexicanos con lupus eritematoso generalizado (LEG) hospitalizados o ambulatorios y diagnosticados con base a los criterios de clasificación de 1982 del Colegio Americano de Reumatología.

Para formar el grupo control se tomaron aquellos sujetos con valores de anticuerpos anti-Sm por abajo de los niveles mínimos considerados como positivos

Los 68 mestizos mexicanos con LEG se sometieron a la determinación de autoanticuerpos anti-Sm por ELISA (ImmunoWell) y a 57 de éstos pacientes se les tipificaron los antígenos de histocompatibilidad (HLA).

Como grupo de comparación se tomaron datos del Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Subirán" (INNSZ) de 85 individuos sanos a los cuales se les realizó la tipificación de los antígenos de histocompatibilidad y cuyas frecuencias de antígenos se compararon con los resultados obtenidos de los 57 mestizos mexicanos con LEG.

Detección de Autoanticuerpos Anti-Sm en el Suero

Se utilizaron equipos comerciales de análisis inmunoenzimático (ImmunoWell), para medir los niveles de anticuerpos en el suero de los 68 pacientes.

Metodología

Se diluye el suero a probar en los micropozos recubiertos con el antígeno. Si el anticuerpo está presente en el suero, éste se unirá al antígeno durante la incubación.

El segundo paso involucra la adición de una antiglobulina marcada con una enzima la cual se une a los anticuerpos. Después de una segunda incubación se lava la placa.

Posteriormente se agrega una disolución del sustrato-cromógeno el cual es hidrolizado por la enzima y produce un producto colorido directamente proporcional a la cantidad de anticuerpos presente en el suero problema.

Finalmente se agrega una disolución bloqueadora para detener la reacción y leerla en un espectrofotómetro en rango visible.

Descripción de la Técnica

Todos los reactivos deben ser utilizados a temperatura ambiente (22-27° C) antes de correr cualquier ensayo.

- 1.- Se fija el número de tiras con micropozos en el marco de micropozos e inmediatamente se aseguran con la tira retenedora removible. Tomar en cuenta los pozos para el blanco, 2 controles negativos y 3 controles positivos para cada prueba.**
- 2.- En una serie de tubos, diluir las muestras problemas y los controles en los tubos apropiados 1:1 000 (10 microlitros de suero con 1 ml del diluyente del suero).**
- 3.- Se pipetea 100 microlitros del diluyente del suero en el primer pozo que se utilizará como blanco. Se agregan 100 microlitros de las diluciones del suero problema y de los controles en los pozos que se les asigne. Se incuban a temperatura de 22-27°C por 30 minutos.**
- 4.- Se procede a lavar los pozos 3 veces con la solución amortiguadora, ya sea utilizando un lavado automático o manual.**

5.- Se pipetea 100 microlitros del conjugado a cada pozo y se incuba a la misma temperatura del paso 3 por 30 minutos.

6.- Se desecha el conjugado de cada pozo, lavando en 3 tiempos como el paso 4.

7.- Se pipetea 100 microlitros de solución reveladora de color, previamente preparada en cada pozo, incubándola a 22-27° C por 30 minutos.

8.- Para detener la reacción se adicionan 100 microlitros de solución bloqueadora de H₂SO₄ a todos los pozos, se agita para mezclar el contenido de los pozos. Se lee a 405 nm en los 30 minutos siguientes.

Interpretación de Resultados

Los rangos de interpretación de los resultados son:

NEGATIVO	Menor de 0.16
SOBRE EL LIMITE	0.16 a 0.31
POSITIVO	Mayor de 0.31

Tipificación de HLA y Complotipos

Tipificación de HLA.

Los antígenos de histocompatibilidad (HLA) se tipificaron mediante la técnica de microlinfotoxicidad en linfocitos de sangre periférica. Los linfocitos se aislaron mediante gradientes de densidad con Ficoll-Hypaque. Estas células se probaron con un lote comercial de sueros anti HLA (pel Freeze Clinical Systems, Brown Deer, Wisconsin, USA), que definen 16 clases del locus HLA-

A, 37 del locus B y 12 del DR. Para la tipificación del HLA-DR se utilizó la técnica del VIII Taller Internacional de Histocompatibilidad en Oxford, Inglaterra; se aislaron los linfocitos B por medio de roseteo con glóbulos rojos de carnero (las células B se unen a los eritrocitos de carnero y posteriormente se separan de ellos incubándolos a 4°C).

Posteriormente se incuban los linfocitos B con los antisueros. De este modo, los anticuerpos presentes en los antisueros se unen a los sitios antigénicos correspondientes sobre la membrana del linfocito B y después se añade suero de conejo como fuente de complemento, y así se lisa la membrana celular. Posteriormente se tiñen con eosina las células y se fijan con formalina. Las células así teñidas indican reacción positiva antígeno-anticuerpo.

Tipificación de C2

El polimorfismo de C2 se tipificó por medio de isoelectroenfoque de plasma o suero en geles de poliacrilamida. Se revelaron los patrones por medio de un ensayo hemolítico con eritrocitos de carnero sensibilizados y suero humano diluido 1:90 (lo cual lo hace deficiente en C2) en solución salina con veronal, con 0.1% de gelatina con $Mg^{2+} 1 \times 10^{-3}$ y $Ca^{2+} 1.5 \times 10^{-4}$. El patrón de bandas de lisis es característico para cada alelo. El gen estructural de C2 tiene 3 alelos designados como C2*A, C2*B y C2*C.

Tipificación de C4

El ácido siálico de la muestra de plasma se eliminó mediante incubación con neuraminidasa tipo VI obtenida de Clostridium perfringens (Sigma Chemical Co. St. Louis, Mo.) a una concentración de 10U de enzima por mililitro de plasma, durante 18 horas a 4°C. Esto se realizó

simultáneamente a la diálisis de la muestra contra un amortiguador de fosfatos que contenía 0,005 mol/l de Na₂EDTA. Las variantes estructurales se detectaron por electroforesis del plasma en geles de agarosa e inmunofijación con anti-C4 humano. Se realizó una inmunoelectroforesis cruzada de muestras de plasma para detectar haplotipos con alelos nulos en heterocigosis.

Tipificación del Factor B

Se tipificó el factor B con muestras de plasma EDTA que se sometieron a una electroforesis en geles de agarosa con amortiguador de barbital 0.05 mol/ml, que contenía lactato de calcio (1.8 mol/ml). Los patrones se identificaron mediante inmunofijación con anti-factor B humano de cabra (Atlantic antibodies, Scarborough, Maine) según Alper C.A. y col. (1976).

Nomenclatura de Genes del Complemento

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

En el locus C4A existen seis variantes estructurales comunes, designadas como C4A*1 hasta C4A*6 y una variante nula, designada como C4A*Q. En el locus C4B hay cinco variantes estructurales comunes, designadas como C4B*1 hasta C4B*5 así como una variante nula, C4B*QO. Los alelos de éstos genes se heredan en bloque (y son llamados complotipos).

Análisis Estadístico

Todos los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente por la prueba Chi-cuadrada y de Maentel Haenszel o la exacta de Fisher.

Resultados

De los 68 mestizos mexicanos con LEG incluidos en este estudio, 61 de ellos fueron del sexo femenino y los 7 restantes del sexo masculino. La edad promedio fué de 33.8 años con un tiempo promedio de evolución de la enfermedad de 9.5 años.

Los resultados en cuanto a frecuencia de antígenos de los 57 sujetos a los cuales se les realizó la tipificación del HLA se muestran en las tablas de la I a la V. Se observa en la tabla I que el antígeno más frecuente del locus HLA-A es el A2 con un 61.4%, seguido por el A9 con un 29.8%, el A3 y A28 con un 17.5% respectivamente y el menos frecuente fue el A34 con un 1.7% (no se representa en la tabla I).

Del locus HLA-B el antígeno con mayor porcentaje fue el B35 con un 21% seguido de cerca por el B14 con un 19.2%. El 27 tuvo un porcentaje del 10.5% y el de menor frecuencia fue el B41 con un 1.7%.

En el locus HLA-C el antígeno con mayor frecuencia fue el Cw6 junto con el Cw4 con un 14%, seguidos por el C1 con un 12.2% y el C3 con un 10.5%.

En la tabla II se muestran las frecuencias de los antígenos de la subregión HLA-DR de la población en estudio mostrando que el HLA-DR4 fue el más frecuente con un porcentaje de 47.3%. El HLA-DR3 y el DR7 tuvieron

ambos una frecuencia de 33%. El menos frecuente del locus HLA-DR8 con un porcentaje del 10.5%.

El antígeno HLA-DQw3 está presente en un 66.8% de los individuos como se muestra en la **tabla II**, mientras que el DQw1 fue el de menor porcentaje con un 54.3%.

En cuanto a los antígenos del HLA-DRw, el DRw53 tuvo una ocurrencia del 68.4%.

De los **complotipos**, el más frecuente fue el SC31-2 con un 57.3%, el SC31-1 con un 21.1%, el SC01-2 con un 17%, el SC30-2 con un 15.7%, el SC42-2 con un 12.2%, el SC01-1 con un 10.5% y el de menor frecuencia el SC20-2 con un 1.7% (**tabla V**).

De los 68 individuos a los cuales se les realizó la determinación de los niveles de autoanticuerpos Anti-Sm, 33 fueron positivos, lo que da como resultado un porcentaje de 48.5%. Esta frecuencia no varió en los 57 sujetos a los cuales se les hizo la tipificación del HLA pues del total de éstos 28 individuos fueron positivos arrojando un porcentaje de 49.1%.

En la **tabla IV** se muestran las asociaciones que tuvieron diferencias estadísticamente significativas con P menores a 0.05. De los antígenos de la clase I, el locus HLA-A presentó asociaciones positivas. El antígeno HLA-A9 se obtuvo una $P=0.035$, indicando la importancia como factor de riesgo para la producción de los anticuerpos Anti-Sm.

De los antígenos del locus B se obtuvieron 3 asociaciones significativas, dos de ellas positivas y una negativa. El HLA-B27 presentó una alta significancia estadística con una $P=0.01$ y el HLA-B7 con una diferencia significativa de una $P=0.04$. La asociación negativa correspondió al HLA-B14 en la producción de los anticuerpos Anti-Sm con una $P=0.003$ confirmando un factor de protección para la producción de los Anti-Sm.

En el resto de los antígenos del HLA clase I, II y III no se presentaron asociaciones estadísticamente significativas, pero se observa en la **tabla III** en que el Cw4 está aumentado en porcentaje negativo con un 7% más asociado con el anticuerpo Anti-Sm. De igual manera se encuentra el DR1 asociado negativamente con el Anti-Sm en más de un 50%.

En la misma **tabla** se presenta en subregión DR, un aumento en frecuencia en el DR2 y DR5 de un mínimo de un 50% más de presentación cuando el anticuerpo está presente.

Las asociaciones con diferentes combinaciones de HLA clase I, y II se muestran en la **tabla V**. Se encontró una asociación negativa del A2/A19 con el anticuerpo Anti-Sm de un 7% aproximadamente.

Por último obtuvimos en la **tabla V** que las cuatro combinaciones de DR2/DR4 fueron positivas a los anticuerpos Anti-Sm con un porcentaje de 5.2%.

En la comparación de la frecuencia de los antígenos del HLA clase I y II entre los 57 pacientes de nuestro estudio y los datos obtenidos del HLA en 85 controles sanos (**tabla VII y VIII**), observamos que en el locus HLA-A se presentó una diferencia en porcentaje en el A3 con un 10% más en pacientes con LEG que en sujetos sanos.

En el HLA-B, el antígeno B12 y el B16 se presentaron en sujetos sanos en un 27% mientras que en pacientes con LEG solo fue de un 3 a un 10%. En el HLA-C los antígenos con mayor diferencia en cuanto a porcentaje fueron el C1, C4 y C6 con un 12%, 14% y 14% respectivamente en pacientes con LEG, mientras que en los sujetos sanos fue de un 2%, 2% y 1% respectivamente.

TABLA V FRECUENCIA DE COMLOTIPOS (EN 57 PACIENTES)

COMLOTIPO	N	FRECUENCIA
SC31-2	34	0.573
SC31-1	12	0.211
SC01-2	10	0.170
SC30-2	9	0.157
SC42-2	7	0.122
SC01-1	6	0.105
FC31-2	5	0.085
SC30-1	4	0.070
SC32-2	2	0.035
SC31-1	1	0.017
SC20-2	1	0.017
SC04-1	1	0.017
XXXX	22	0.385

XXXX= REPRESENTA EL NUMERO DE INDIVIDUOS QUE NO SE TIPIFICARON.

TABLA VI. - FRECUENCIA FENOTIPICA DE ANTIGENOS DEL HLA CLASE I
EN 85 INDIVIDUOS SANOS

ANTIGENO	CLASE I	
	N	FRECUENCIA
A2	46	0.541
A9	23	0.271
A19	20	0.235
A28	19	0.224
A1	11	0.129
A10	8	0.094
A3	6	0.071
A11	5	0.059
AX	4	0.047
B35	24	0.282
B12	23	0.271
B16	23	0.271
B5	20	0.235
B40	13	0.153
B14	9	0.106
B7	6	0.071
B13	6	0.071
B15	5	0.059
B17	5	0.059
B8	4	0.047
B18	3	0.035
B21	3	0.035
B22	3	0.035
B27	3	0.035
B53	2	0.024
B41	1	0.012
B48	1	0.012
B70	1	0.012
BX	1	0.012
C1	2	0.024
C2	2	0.024
C4	2	0.024
C3	1	0.012
C6	1	0.012
CX	79	0.929

FUENTE: DATOS DEL INNSZ.

TABLA VII. FRECUENCIA FENOTIPICA DE ANTIGENOS DEL HLA CLASE II EN 85 INDIVIDUOS SANOS.

CLASE II		
ANTIGENO	N	FRECUENCIA
DR4	36	0.424
DR7	25	0.294
DR1	21	0.247
DR2	17	0.200
DR5	15	0.176
DR8	12	0.141
DR3	9	0.106
DR6	8	0.094
DQw3	50	0.588
DQw1	43	0.506
DQw2	33	0.388
DRw53	55	0.647
DRw52	38	0.447

FUENTE: Datos del INNSZ.

TABLA VIII. COMPARACION DE FRECUENCIA DE LOS ANTIGENOS DEL HLA CLASE I EN PACIENTES CON LEG Y EN INDIVIDUOS SANOS.

ANTIGENO	CLASE I			
	SANOS		LEG	
	N	P%	N	P%
A2	46	54	35	61
A9	23	27	17	29
A19	20	23	9	15
A28	19	22	10	17
A1	11	12	7	12
A10	8	9	4	7
A3	6	7	10	17
B35	24	28	12	21
B12	23	27	2	3
B16	23	27	6	10
B5	20	23	10	17
B40	13	15	4	7
B14	9	10	11	19
B7	6	7	10	17
C1	2	2	7	12
C2	2	2	5	8
C4	2	2	8	14
C3	1	1	6	10
C6	1	1	8	14

N= NUMERO

P=PORCENTAJE

**TABLA IX COMPARACION DE FRECUENCIA DE LOS ANTIGENOS DEL
HLA CLASE II EN PACIENTES CON LEG Y EN INDIVIDUOS
SANOS**

ANTIGENO	CLASE II			
	SANOS		LEG	
	N	P %	N	P%
DR4	36	42	27	47
DR7	25	29	19	33
DR1	21	24	9	15
DR2	17	20	15	26
DR5	15	17	7	12
DQW3	50	58	38	66
DQW1	43	50	31	54
DQW2	33	38	27	47
DRW53	55	64	39	68
DRW52	38	44	31	54

N= NUMERO

P=PORCENTAJE

DISCUSION

Para encontrar alguna relación de riesgo en las asociaciones del anticuerpo Anti-Sm con los alelos del HLA, se tomaron en cuenta como punto de corte la media de los normales mas 2 desviaciones estándar. En la clase I se encontraron diferencias estadísticamente significativas para el locus HLA-A9 confiriendole un factor de riesgo en la producción del autoanticuerpo Anti-Sm, aunque es una asociación que no ha sido descrita por ninguno de los trabajos publicados, hechos en poblaciones blanca, negra o asiática que describen Anti-Sm con el HLA-B6, DR2, DR3 o DQw6, su significancia estadística es bastante sólida como para apoyar al A9 como factor de riesgo en la producción del Anti-Sm en mestizos mexicanos con LEG.

Llama la atención la asociación del locus HLA-B27 como factor de riesgo para la producción de anticuerpos Anti-Sm, pues de 6 casos positivos para el B27 los 6 tuvieron títulos elevados de Anti-Sm. Este antígeno B27 está asociado con varias enfermedades como la espondilitis anquilosante y el síndrome de Reitter.

La otra asociación significativa de la subregión B fue el HLA-B7, que al igual que el B27, no ha sido asociado con el Anti-Sm en los trabajos realizados en España, Italia y países Sajones o Asiáticos.

En el análisis también se observaron asociaciones negativas del anticuerpo Anti-Sm con antígenos de las clase I del HLA. El locus B14 que presentó un nivel de significancia estadística (tabla IV), sugiriendo su presencia en una población normal un papel "protector" para la producción del anticuerpo Anti-Sm, que como ya se mencionó es específico para el LEG. Al igual que los anteriores antígenos que tuvieron significancia estadística, esta asociación negativa no ha sido reportada en la bibliografía mundial.

Con respecto al HLA-B14 sólo se ha reportado asociación positiva con hemocromatosis.

Respecto a los demás antígenos de clase II no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, lo que se obtuvo fue un aumento en el porcentaje del DR2 y DR5 asociado positivamente con la producción de anticuerpos Anti-Sm. Esta asociación se ha reportado en estudios hechos en raza negra y un grupo de japoneses. La principal asociación encontrada hasta el momento del HLA-DR2 en otras razas como sajones, españoles o japoneses es con la producción con autoanticuerpos anti-La y anti-Ro.

Los otros dos antígenos asociados sin estar descritos en la literatura son el Cw1 y el DR1, que de manera inversa al DR2 y DR5 se correlacionaron negativamente con la producción de autoanticuerpos Anti-Sm.

Del resto de las combinaciones ninguna fue significativa, pero hubo algunas que presentaron mayor diferencia en cuanto a ocurrencia (tabla V). El que cobra mayor importancia es DR2/DR4 que en todas las ocasiones que se presentó se asoció positivamente con la producción de autoanticuerpos Anti-Sm, indicando la importancia de la subregión DR en la respuesta inmune para la formación de anticuerpos Anti-Sm.

Por otra parte, la frecuencia y porcentaje del autoanticuerpo Anti-Sm es superior a lo reportado en estudios en población sajona, donde el porcentaje es de aproximadamente un 30%, teniendo un 20% menos que lo que encontramos en la población mestiza mexicana.

De lo anterior podemos decir que los antígenos que se correlacionaron con la producción de anticuerpos (HLA-A9, B27, B7, y B14) son diferentes a los que se correlacionaron con la producción de la enfermedad, sugiriendo que la presentación de la enfermedad está influida por diferentes genes, lo mismo parece ocurrir en la producción de los anticuerpos.

CONCLUSIONES

Aunque aún no se han definido los genes responsables de las asociaciones de la producción de autoanticuerpos con el HLA y de éste con la presentación de la enfermedad, se puede concluir de acuerdo a los resultados en mestizos mexicanos que la producción del anticuerpo Anti-Sm está asociado positivamente con el locus HLA-B, en particular con el HLA-B7 y el HLA-B27 y con una asociación negativa con el HLA-B14. De menor importancia fué la correlación con el HLA-DR2 y negativa con el DR1. De lo anterior se concluye que el gen relevante de la producción del autoanticuerpo Anti-Sm está entre el locus B y el DR, más cercano al locus HLA-B.

También concluimos que las diferencias en frecuencias del anticuerpo Anti-Sm y su relación con el HLA pueda deberse a diferencias en la genética de poblaciones y/o la presencia del micro y macro ambiente en individuos de distinto origen étnico.

BIBLIOGRAFIA

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

1. Fessel WJ: Systemic lupus erythematosus in the community. Arch Intern Med 134:1027-1035,1974.
2. Michet CJ, McKenna CH, Elveback LR, et al: Epidemiology of systemic lupus erythematosus and other connective tissue diseases in Rochester, Minnesota, 1950 through 1977, Mayo Clin Proc 60:105-113, 1985.
3. Lisker R., Ramirez E., Perez VR, Granados J. and Babinsky V: Gene Frequencies and admixture estimates in four mexican urban centers. Human Biology, Vol. 62, 791-801, 1990.
4. Lisker R., Ramirez E., Perez VR, Granados J. and Babinsky V: Gene Frequencies and admixture estimates in the state of Puebla, México. American Journal of Physical Anthropology, 76, 331-335,1988..
5. Lisker R., Ramirez E., Perez VR, Granados J. and Babinsky V: Gene Frequencies and admixture estimates in a Mexico City population. American Journal of Physical Anthropology, 79, 105-107, 1986.
6. Alarcón -Segovia D: The pathogenesis of immune dysregulation in systemic lupus erythematosus: a troika. J. Rheumatol 11, 588-590,1984.
7. Tan EM: Autoantibodies to nuclear antigens (ANA). Their immunobiology and medicine. Adv. Immunol 33:167-240,1982.
8. Hooberg MC: The application of genetic epidemiology to systemic lupus erythematosus: J Rheumatol 14:867-869, 1987.
9. Altman DM, Sansom D., Marsh SGE: What is the basis for HLA-DQ associations with autoimmune disease. Immunology Today 12 (8), 267-270. 1991.

10. Alvarellos A, Ahearn JM, Provasi TT, Sorsch CA, Stevens MB, Bias W, Arnett FC: Relationships of HLA-DR and MT antigens to autoantibody expression in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, 26,1533-1535, 1983.
11. Tiwari JL and Terasaki PI, 1985 HLA and disease associations. New York Springer Verlag.
12. Gufzar V, Linker R., Armendares S. Temas Selectos de Biomedicina. DEMSA. México, (1991)
13. Bell DA, Maddison PJ: Serologic subsets in systemic lupus erythematosus. An examination of autoantibodies in relationship to clinical features of disease and HLA antigens. *Arthritis Rheum* 23(11), 1268-1273, 1980.
14. Dunham I, Sargent CA, Trowsdale H, Campbell RD: Molecular mapping of the human major histocompatibility complex by pulsed-field gel electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci USA* 84, 7237-7241, 1988.
15. Fujisaku A, Barto Frank M, Neas B, Reichlin M, Harley JB: HLA-DQ gene complementation and other histocompatibility relationships in man with the anti-Ro/SSA auto antibody response of systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 86, 606-611, 1990.
16. Green Jr, Montasser M, Woodrow JC: The association of HLA-linked genes with systemic lupus erythematosus. *Am Hum Genet* 50,93-96, 1986.
17. Hamilton RG, Harley R, Bias W, Roebber M, Reichlin M, Hochberg MC, Arnett FC: Two Ro (SSA) responses in systemic lupus erythematosus. Correlation of HLA-DR/DQ specificities with quantitative expression of Ro (SS) autoantibody. *Arthritis Rheum* 31(4), 496-505, 1988.

18. Hartung K, Fontana A, Klar M, Krippner H, Jorgens K, Lang B, Peter H, Pichler W, Schendel D, Robin-Winn M, Deicher H: Association of class II and III MHC gene products with systemic lupus erythematosus. Results of a Central European multicenter study. *Rheumatol Int* 9, 13-18, 1989.
19. Hocheberg MC: The application of genetic epidemiology to systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 14, 876-869, 1987.
20. Lange A, Sedlářimská M, Jacak-Laba A, Nowakowska B, Swana G, Klimozac A, Laba C: Variants of SLE: differentiation on the basis of clinical symptoms, autoantibodies and HLA antigens. *Lupus* 1 (suppl), 32.
21. Olsen NJ, Chen PP: Immunogenetics of autoantibodies and autoimmune diseases: Current Opinion *Rheumatology* 3, 391-397, 1991.
22. Shoenfeld Y, Isenberg DA, Rauch J, Madaoi M, Mozes E, Schwartz R: Idiotypic cross reaction of monoclonal lupus autoantibodies. *J Exp Med* 158, 718-730, 1983.
23. Gómez-Reino JJ, Martínez LJ, Vicario JL, Paz AE : Immunogenetics of systemic lupus erythematosus in Spanish patients. *Immunobiology*. 182 (5), 465-71, 1991.
24. Arnett FC: Molecular analysis of major histocompatibility complex alleles associated with the lupus anticoagulant. *J Clin Invest*, 87(5), 149-5, 1991.
25. Lulli P, Sebastiani GD, et al: HLA antigens in Italian patients with for the association of DQw2 with the autoantibody response to extractable nuclear antigens. *Clin Exp Rheumatol* 2(5), 475-9, 1991.
26. Thompson D: The clinical significance of autoantibody in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus*, 2(1), 125-9, 1993.
27. Galeazi M, Sebastiani GD: HLA-DP genotyping in patients with systemic lupus erythematosus: correlations with autoantibody subsets. *J Rheumatol* 19(1), 42-6, 1992.

28. Olsen ML, Arnett FC, Reveille JD: Contrasting molecular patterns of MHC class II alleles associated with the anti-Sm and anti-RNP precipitin autoantibodies in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, 36(1), 94-104, 1993.
29. Alper CA. 1976. Inherited structural polymorphism in human C2: evidence for genetic linkage between C2 and BF. *J. Exp. Med* 144:1111-1115.
30. Shwos TB, Alper CA, Bootsma D, Dorf M, Douglas T, Kit set al. 1979. International system for human genetic nomenclature (1979). *ISGN Cytogenet Cell Genet* 1979, 25:96-116.
31. Goldstein R, Sengun DP: Comparative studies of the major histocompatibility complex in French Canadian non-French Canadian Caucasians with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, Aug 1993 36(8) p1121-7.

Agradecimientos

Agradezco al Méd. Cir. Alberto Dfaz Ponce su invaluable ayuda para la realización del presente trabajo.

A mi padre fallecido en 1996 y a mi madre por su gran amor.

A Eloisa por su paciencia y cariño en momentos difíciles.

A todos mis profesores y compañeros sin los cuales nunca hubiera logrado este trabajo.

A mis sinodales por sus consejos y asesoría.

A Gustavo Acosta como Director de Tesis y amigo por tus sabias correcciones en los momentos adecuados.

Al ser que vendrá a iluminar mi vida.