

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

"ZARAGOZA"

**ANTIGENOS LEUCOCITARIOS HUMANOS (HLA) ASOCIADOS CON LUPUS
ERITEMATOSOS SISTEMICO (LES).**

NOMBRE: ADAN JIMAREZ GUTIERREZ

N° DE CUENTA: 8821802-7

AÑO EN QUE TERMINA LA CARRERA: 1996

ORIENTACION: Q.F.B. CLINICOS

AREA ESPECIFICA DEL PROYECTO: INMUNOLOGIA

ASESOR INTERNO: RUBEN MARROQUIN SEGURA.

DIRECTOR DE TESIS: MA. DE LOS DOLORES DELGADO OCHOA.

HOSPITAL JUAREZ DE MEXICO.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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.

INDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCION	2
- ETIOPATOGENESIS	3
- DIAGNOSTICO	7
- TRATAMIENTO	9
- COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD	10
- MHC ASOCIADO CON ENFERMEDADES	19
- ASOCIACION DE ANTIGENOS CLASE I Y II CON LES	20
- ASOCIACION DE ANTIGENOS CLASE III CON LES	23
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	26
4. OBJETIVOS	26
5. HIPOTESIS	26
6. MATERIAL Y METODOS	27
7. DIAGRAMA DE FLUJO	32
8. ANALISIS ESTADISTICO DE DATOS	36
9. RESULTADOS	37
10. DISCUSION DE RESULTADOS	45
11. CONCLUSIONES	47
12. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	48

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Este trabajo, se realizó en el Hospital Juárez de México de la Secretaria de Salud, en la División de Investigación y Enseñanza en el Laboratorio de Histocompatibilidad bajo la dirección de la Q.B.P. Ma. de los Dolores Delgado Ochoa

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

AGRADECIMIENTOS

A la QBP Ma de los
Dolores Delgado Ochoa
por el gran apoyo y confianza
para la dirección de esta tesis.

A los miembros del jurado:
Dr Rubén Marroquín Segura.
M. en C. Catalina Machuca
Rodríguez.
QFB Angel García Sánchez
QFB Rosalba Barrera Martínez.
por sus comentarios y consejos
en la revisión de este trabajo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DEDICATORIAS

A mis padres y hermanos
con respeto y cariño por
el apoyo brindado.

A mi esposa Claudia
López Vivas
por su apoyo incondicional.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1. RESUMEN

El Lupus Eritematoso Sistémico (LES) es una enfermedad autoinmune, inflamatoria crónica, progresiva, multisistémica de causa desconocida que puede afectar diferentes órganos y con incidencia en la población mexicana.

La incidencia en México varía de 1 caso por cada 2500 personas, de las cuales la mayoría son mujeres con una edad de 14 a 40 años.

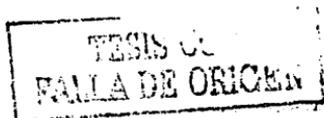
El LES es el más representativo de los procesos autoinmunes y el más complejo desde el punto de vista clínico; ya que tiene una gran variedad de patrones de expresión, que pueden afectar cualquier órgano, con periodos de actividad e inactividad. Su carácter de síndrome en el que caben etiologías, fisiopatologías y pronósticos diferentes en que puede manifestarse, requieren la aplicación de un cuidadoso estudio diagnóstico.

En él se reconocen factores genéticos asociados con susceptibilidad, dentro de estos se han descrito asociaciones con alelos de los genes del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC), lo cual encaminó a realizar un estudio, para identificar la frecuencia de Antígenos Leucocitarios Humanos (HLA) Clase I y II en mujeres que presentan LES, con la finalidad de encontrar un marcador genético que nos pueda ayudar en el diagnóstico de la enfermedad.

Se estudiaron 30 mujeres con diagnóstico clínico de LES, así como un grupo control de 50 personas sanas donadoras de riñón; realizando la tipificación serológica de su HLA mediante la técnica de microlinfotoxicidad en placa.

Los resultados obtenidos se cuantificaron mediante una tabla de contingencia 2 X 2, observando un aumento significativo de los alelos B8, DR3, DR15, DQ3 y DQ5 en pacientes que presentan LES con respecto a la frecuencia encontrada en el grupo control, en donde el Riesgo Relativo (R.R) para los pacientes positivos a estos antígenos fueron: HLA-B8 (R.R=4.8), HLA-DR3 (R.R=3.5), HLA-DR15 (R.R=24.5), HLA-DQ3 (R.R=24.5), HLA-DQ5 (R.R=2.87).

Aunque muchos otros antígenos dentro de la tabla de análisis muestran R.R altos mayores a "1" no podemos relacionarlos con LES, debido a que el número de pacientes que lo presentaron es muy reducido ó son antígenos que se presentan comúnmente en la población mestiza mexicana, lo que sugiere que los resultados no son estadísticamente significativos, para los antígenos de clase I. Encontrándose asociaciones consistentes en los alelos de los genes clase II (HLA-DR y DQ) en comparación con los genes de clase I, en particular con los alelos HLA-DR3, DR15, DQ3 y DQ5 que muestran el papel de los genes del MHC en la susceptibilidad genética a desarrollar LES en mexicanos y confirma algunos datos encontrados en otros estudios realizados en pacientes mexicanos con LES.



2. INTRODUCCION.

LUPUS ERITEMATOSOS SISTEMICO (LES).

El Lupus Eritematosos Sistémico (LES) es una enfermedad inflamatoria crónica, progresiva y multisistémica de etiología desconocida, que representa un espectro de alteraciones autoinmunes, sus características son:

1. Clínicamente: es impredecible, remitente, recurrente, de inicio insidioso o agudo, que puede afectar a casi cualquier órgano, pero principalmente piel, riñones, membranas serosas, articulaciones y corazón.
2. Anatómicamente: los sitios de afección tienen en común lesiones vasculares con depósitos fibrinoides.
3. Inmunológicamente: comprende un conjunto de anticuerpos de origen autoinmunitario (24,25)

El nombre de "lupus" se debe en parte al exantema facial que presentan los pacientes con este padecimiento, el cual se considero emparentado con la tuberculosis cutánea; el término lupus proviene del Latín "lobo", para describir las ulceraciones eritémicas semejantes a las causadas por la mordedura de un lobo, aunque existen descripciones muy semejantes desde el año 400 a.C. por Hipócrates en Grecia, con el nombre de Herpes estiomenos.

No fue sino hasta 1828 cuando el francés Biewwt, describió por primera vez la forma localizada y benigna del lupus discoide. El término lupus eritematoso fue usado por Cazenare y Clausit en 1852; en 1875 Kaposi diferencia el lupus discoide del sistémico. William Osler (1895-1903) describe muchas de las características clínicas del LES, estas incluyen artralgia, alteraciones del Sistema Nervioso Central (SNC), nefritis, crisis gastrointestinales, endocarditis y pericarditis.

En 1941, Paul Klemperer, publicó las lesiones anatómo-patológicas en éste tipo de pacientes y acuño por primera vez el termino de Enfermedades de la Colágena en donde incluía el lupus como enfermedad prototipo.

En 1946, Malcolm Hargraves descubre la célula LE (Lupus eritematoso) en la medula ósea de un paciente con LES.

La aplicación de los criterios de clasificación del LES por la Asociación Americana de Reumatología (ARA) de 1971 y 1982, permitió conocer mejor los aspectos de prevalencia, incidencia, distribución racial, edad, sexo y mortalidad. (14)

Existen tres tipos de Lupus, la forma localizada o discoide, la forma generalizada o sistémica y el lupus por fármacos. De todos ellos, la forma sistémica es la más frecuente por la gran variedad de síntomas y diversidad de formas de tratamiento. La forma discoide, es también llamada lupus benigno, porque en el 90% de los casos se limita a afectar solamente la piel, pero de un 8 al 10% de éstos pacientes pueden eventualmente cambiar a la forma sistémica y afectar todos los órganos; el lupus por fármacos desaparece al suspender el medicamento causante.

El LES es una enfermedad, cuya incidencia es de un caso por cada 2500 personas en ciertas poblaciones; existe una fuerte preponderancia femenina, aproximadamente 10 a 1 con respecto a los hombres. Es más frecuente entre los 15 y 35 años de edad, pero se puede manifestar a cualquier edad, incluso en las primeras etapas de la infancia. La enfermedad es frecuente y grave en estadounidenses de raza negra, familias mestizas mexicanas y orientales, con una supervivencia mayor a cinco años. (49, 51, 41)

A).-ETIOPATOGENESIS.

El LES parece ser consecuencia de una alteración de regulación inmunológica, donde las células T y las células mononucleares productoras de linfocinas y monocinas participan en la activación y diferenciación de las células B, resultando en la activación policlonal de las células B, provocando la proliferación de todas las células productoras de anticuerpos incluso de las productoras de autoanticuerpos. En teoría, podría originarse por un defecto intrínseco en las células B, provocado por una estimulación excesiva de células T cooperadoras ó defecto en las células T reguladoras que no logran refrenar las reacciones de las células B. Estudios relacionados sugieren que la respuesta de autoanticuerpos es específica, inducida por el antígeno y no se debe a una activación policlonal de las células B. Donde la producción de autoanticuerpos se podría ver estimulada por alguna anomalía de la red idiotipo-antiidiotipo. (25, 30, 18)

En los pacientes con LES se han identificado autoanticuerpos en función de componentes nucleares y citoplásmaticos de las células, como se muestra en el cuadro No. 1.

Los anticuerpos antinucleares (ANA) se dirigen contra diversos antígenos nucleares y pueden agruparse en cuatro categorías:

- 1) ADN.
- 2) Histonas.
- 3) Proteínas no histonas unidas a ARN.
- 4) Antígenos nucleares.

Los anticuerpos más característicos del LES son los dirigidos contra el ADN especialmente contra el ADN bicatenario (ADNds), los anticuerpos frente al ADN monocatenario (ADNss) son menos específicos y pueden aparecer en otros trastornos. Inicialmente los anticuerpos frente a las proteínas extraíbles del núcleo fueron denominados, mediante iniciales de los pacientes en que se detectaron por primera vez, por ejemplo Sm por Smith. Se encuentran en una proporción variable de pacientes con LES, en el 5% en individuos de raza blanca y en el 25% en individuos de raza negra y en chinos. Existen dos anticuerpos bastante frecuentes, específicos de las partículas Ro y La, que en un principio se pensó eran RNP (Ribonucleoproteínas), pero que se han detectado en el núcleo. (16, 31, 32)

CUADRO No 1 Anticuerpos y antígenos en LES

Sistema de anticuerpo	Naturaleza del antígeno	Frecuencia %
ADN nativo	ADN de doble cadena	40-60
ADN monocatenario	ADN de cadena sencilla	70
Histonas	H1, H2A, H2B, H3, H4	70
Anti.Sm	Ribonucleoproteínas de 29, 28, 16, 13KD formando complejos con U1, U2, U4-U6 sn RNAs	30
SS-A (Ro)	Ribonucleoproteína de 60-52 KD	30-40
SS-B (La)	Ribonucleoproteína de 48KD formando complejos con RNA naciente de la transcripción de RNA pol II	15
RNP nuclear-U1	Proteínas de 70, 33 y 22KD formando complejos con U1 snARN.	32
PCNA	Antígeno nuclear de proliferación celular auxiliar de la DNA polimerasa w.	3
Ku	Proteínas de 80-66 KD de unión a DNA	10
Scl 70	ADN topoisomerasa I	< 5
Jo-1	Histidil-t ARN sintetasa	< 5
Anticentrómero	Proteínas centroméricas	< 5
Ma	Antígeno del Aparato Mitótico	20

Tan Eng M 1989 (52)

Estos autoantígenos intervienen en funciones celulares importantes, como replicación de ADN, transcripción, edición del precursor del ARNm, traducción, entre otras.

El paciente con LES presenta en promedio de 3 a 4 de estos autoanticuerpos. Estos inmunógenos conducen a una respuesta inmune contra partículas o agregados de partículas subcelulares como el edisoma que se ensambla durante el proceso de edición del precursor del ARNm. Estas partículas son exteriorizadas por muerte, daño celular u otras razones y uno o varios componentes de esta partícula pueden convertirse en blanco de la respuesta inmune, la cual puede ser regulada secundariamente por factores genéticos, como los genes HLA clase II.

Además de los anticuerpos antinucleares los pacientes presentan autoanticuerpos dirigidos contra elementos de la sangre como eritrocitos, plaquetas y linfocitos, originando anemia hemolítica, trombocitopenia y linfopenia alterando la inmunoregulación. Así como anticuerpos dirigidos contra fosfolípidos aniónicos. Algunos se fijan al antígeno cardiolípina, usado en la serología del sífilis resultando positivo falso. Ya que se requieren fosfolípidos para la coagulación sanguínea, los

pacientes con dichos anticuerpos muestran anomalías en las pruebas de coagulación, como el tiempo de tromboplastina parcial, apareciendo complicaciones relacionadas con un estado procoagulante; padecen trombosis venosas y arteriales, isquemia ocular o cerebral focal. Los mecanismos de daño incluyen lesión directa de las células endoteliales, activación plaquetaria mediada por anticuerpos e inhibición de los anticoagulantes endógenos como la proteína C. (12,18)

Lo que no está claro es si los anticuerpos son causantes del síndrome, ya que la transfusión de suero con títulos elevados de ANA no inducen LES. Como ocurre con otras enfermedades autoinmunitarias, la presencia de autoanticuerpos es un marcador del trastorno, pero no un motivo suficiente para que se produzcan las lesiones. Hay muchas teorías sobre la etiología del LES, pero ninguna de ellas explica completamente la enfermedad; "quizá los factores genéticos" determinan las alteraciones inmunológicas y hormonales que hacen susceptibles al huésped a factores ambientales, facilitando la expresión clínica de la enfermedad. Hay algunas evidencias indirectas que sugieren la participación viral en este padecimiento, recientemente la clonación molecular del ADN obtenido del plasma de pacientes con LES, reveló la presencia de secuencias (sonda EG) homólogas al gene gag-pol del virus VIH-1. (13,16,15)

B).- FACTORES GENETICOS.

Las pruebas que apoyan la predisposición genética del LES son varias: La elevada concordancia de la enfermedad en gemelos monocigotos (57%), la mayor frecuencia de la enfermedad en familias con antecedentes de LES en comparación a la población general y los familiares de primer grado clínicamente no afectados pueden tener autoanticuerpos, la asociación con los antígenos DR2 y DR3 con un riesgo relativo de 2 a 3 % y si están presentes ambos antígenos, el riesgo relativo es de aproximadamente 5%; y la deficiencia hereditaria de los factores del complemento C1, C2 y C4. Esta asociación se ha atribuido a la necesidad de la vía clásica para el aclaramiento y solubilización de los complejos inmunitarios circulantes, si los complejos inmunitarios que se generan normalmente no son aclarados de la circulación, debido a la deficiencia de alguno de estos factores del complemento, pueden depositarse en las paredes de los vasos sanguíneos y en los tejidos, donde activan la cascada del complemento y producen la inflamación local. Estas reacciones inflamatorias pueden aumentar las funciones presentadoras de antígeno de los fagocitos mononucleares, provocando la presentación anormal de antígenos propios y la autoinmunidad.

La hipótesis genética y la participación viral se ha visto reforzada por estudios en ratones NZB/Wf1 y BxSB que desarrollan una enfermedad similar al LES, en donde se han identificado genes protectores contra la autoinmunidad como el gen de la inmunodeficiencia ligado al cromosoma X (xid).

Por otro lado se han identificado genes que facilitan la proliferación de células B (Lpr, gld, BxSB-y) en ratones NZB/Wf1 y BxSB; en los primeros se necesitan por lo menos 6 genes para la expresión clínica de la enfermedad y se ha demostrado por lo menos dos familias de genes no relacionados, una que favorece defectos de células primitivas o precursoras y otra que favorece la formación de anticuerpos anti-ADN y otros

anticuerpos. Estos genes pueden ser activados, directa o indirectamente por la influencia de oncogenes (C-Myc) que tal vez pueden provenir de una infección viral (retrovirus) ó pueden ser parte constitutiva del ADN del huésped. (17,35,38,39,15,30)

C).-FACTORES AMBIENTALES.

Los factores ambientales que contribuyen al desarrollo de la enfermedad son: el estrés, desequilibrio nutricional, quemaduras térmicas, exposición a la luz solar (rayos UV) que influyen en la destrucción tisular de la piel en los pacientes con LES, esta liberación de ADNn al espacio extracelular y la migración de antígenos nucleares (Ro/SSA) al citoplasma y membrana celular, favorece la formación de anticuerpos a este antígeno normalmente oculto. Asimismo la radiación UV modifica la relación de células facilitadoras/reguladoras de la respuesta inmune. (13,28,34,35,36)

Los colorantes para el pelo, alimentos y preservadores de los mismos, también pueden desencadenar LES en personas que laboran en industrias en donde manejan éstas sustancias. En cuanto a los alimentos que pueden reactivar la enfermedad, existe en la alfalfa una sustancia, llamada L-canavanina, que contienen todas las leguminosas, y se han reportado casos de ingestión abundante, donde empeora el LES.

La utilización de ciertos fármacos inducen el lupus eritematosos espontáneo, el cual desaparece al suspender el fármaco, y se asocia con el antígeno HLA DR4. Los fármacos involucrados en la producción de tal síndrome son difenilhidantoína, isoniazida, hidralazina, procainamida y clorpromacina, utilizados en el tratamiento de epilepsia, tuberculosis, hipertensión y arritmias cardíacas respectivamente. Otros fármacos producen con menor frecuencia síndromes lupoides como: fenitoína, carbamacepina, penicilamina, sulfasalazina, carbonato de litio, captopril y fenilbutazona. Los pacientes que desarrollan LES por medicamento metabolizan lentamente las sustancias y por esto se les llama acetiladores lentos, especialmente del tipo de las aminas aromáticas.

Entre los posibles mecanismos de inducción de los síndromes provocados por los fármacos están:

- 1) La formación de complejos tóxicos a base de anticuerpos-fármaco.
- 2) Producción de autoinmunógenos por la unión del fármaco a moléculas del huésped en forma de hapteno.
- 3) Alteración de las superficies de las células o las nucleoproteínas del huésped, producido por el fármaco.

Los sujetos con lupus inducido por la hidralazina pueden tener anticuerpos contra el fármaco, así como otros contra el ADN nativo. A diferencia de lo señalado, la procainamida induce la producción de anticuerpos contra ADN desnaturalizado, tal vez por complejos entré el fármaco y el ADN huésped. La procainamida actúa por estabilización de las membranas celulares; puede unirse a las superficies de los eritrocitos, alterar su membrana y originar fragmentos de membrana inmunógenos, que estimulen la formación de autoanticuerpos y anemia hemolítica. La hidralazina y la

isoniazida pueden formar radicales activos que inactivan y alteran el ADN y con ello, producir fragmentos de ADN inmunógeno. (11,37)

D).- FACTORES HORMONALES.

Las hormonas sexuales ejercen una influencia importante sobre la aparición del padecimiento. Los andrógenos protegen en tanto que los estrógenos favorecen el desarrollo de LES, prueba de ello es el afromador predominio de la enfermedad en mujeres. A este respecto se han demostrado niveles séricos disminuidos de testosterona y dihidrotestosterona en pacientes masculinos con LES.

Así como un aumento de la hidroxilación del carbono 16 de la estrona, que resulta en niveles aumentados de 16 α -hidroxiestrone y estriol en pacientes femeninos y masculinos con LES; y una disminución de la hidroxilación en C-2 de la estrona que causa niveles menores de 2-hidroxiestrone y 2-metoxiestrone en mujeres con LES. En conjunto todas estas anomalías tenderían a producir efectos estrogénicos de mayor duración y androgénicos débiles en pacientes, sobre todo en mujeres, lo que podría producir una función más intensa de las células T, lo cual resultaría en alteraciones de la respuesta inmunológica que favorecería el desarrollo de autoanticuerpos (34)

DIAGNOSTICO.

El diagnóstico de LES se basa en 11 criterios propuestos por Cohen en 1982, publicados por la Asociación Americana de Reumatología (ARA), con el propósito de identificar pacientes en estudios clínicos. Se dice que una persona tiene LES si están presentes en forma seriada o simultánea cuatro o más de los 11 criterios durante cualquier intervalo de observación como se muestra en el cuadro No. 2. (14)

CUADRO No 2.-Clasificación de LES según ARA 1982.

CRITERIO	DEFINICION
1.- Eritema malar	Exantema en alas de mariposa fijo plano o elevado sobre las eminencias malares con tendencia a respetar los pliegues nasogenianos.
2.-Eritema discoide	Placas eritematosas levantadas con descamación queratósica adherente y obstrucción folicular, en las lesiones más antiguas puede haber cicatrización atrófica.

- 3.-Fotosensibilidad Erupción cutánea a consecuencia de una reacción rara a la luz solar de acuerdo con la historia del paciente o la observación del médico.
- 4.-Úlceras bucales Ulceración bucal o nasofaríngea, habitualmente indolora, observada por un médico.
- 5.-Artritis Artritis no erosiva que afecta a dos o más articulaciones periféricas, caracterizada por dolor (hipersensibilidad) hinchazón (inflamación) o derrame.
- 6.-Serositis
 a) Pleuritis-historia convincente de dolor pleurítico o frote pleural a la auscultación o derrame pleural.
 b) Pericarditis comprobada mediante ECG o frote, o datos de derrame pericárdico.
- 7.-Trastorno renal
 a) Proteinuria persistente mayor a 0.5 g/dL al día.
 b) Cilindros celulares, pueden ser eritrocitarios, de hemoglobina, granulares, tubulares o mixtos.
- 8.- Trastorno neurológico
 a) Convulsiones en ausencia de fármacos dañinos o alteraciones metabólicas conocidas, p. ejem. uremia, cetoacidosis o alteraciones electrolíticas.
 b) Psicosis en ausencia de fármacos dañinos o alteraciones metabólicas conocidas.
- 9.-Trastorno hematológico
 a) Anemia hemolítica con reticulocitosis.
 b) Leucopenia 4000 células/uL en dos o más ocasiones.
 c) Linfopenia 1500 células/uL en dos o más ocasiones.
 d) Trombocitopenia 100000plaquetas/uL en ausencia de fármacos dañinos.
- 10.-Trastorno inmunitario
 a) Preparación positiva para células LE.
 b) Anticuerpos contra ADN con títulos anormales.
 c) Presencia de anticuerpos contra el antígeno nuclear Sm.
 d) Prueba serológica positiva falsa para sífilis, que haya sido confirmada (como falsa) por inmovilización del Treponema pallidum o prueba fluorescente de absorción de anticuerpos del Treponema.
- 11.-Anticuerpos antinucleares Titulación anormal de anticuerpos mediante inmuno-fluorescencia o una prueba equivalente en cualquier momento y en ausencia de fármacos que se sabe se relacionan con síndrome de "lupus inducido por fármacos".

Tan Cohen 1982.(14)

Con las técnicas diagnósticas recientes, se han identificado formas menos graves de lupus que terminan por desaparecer. Es frecuente observar diversos grados de intensidad que se caracterizan por remisiones y exacerbaciones espontáneas. La prueba confirmatoria es la demostración de los ANA. El método usado con mayor frecuencia es la inmunofluorescencia indirecta, en la cual se reconocen cuatro patrones básicos:

- * La tinción homogénea difusa refleja anticuerpos contra desoxirribonucleoproteínas e histonas.
- * Tinción en anillo o periférico indican con mayor frecuencia anticuerpos contra DNA de doble hélice.
- * Patrón jaspeado, indica anticuerpos contra constituyentes nucleares histonas y RNP. Estos componentes se extraen fácilmente con solución salina y, por tanto, algunas veces se denominan antígenos nucleares extraíbles (ANE), incluyen Sm, SS-A, SS-B.
- * Patrón nucleolar, representa anticuerpos contra el ARN nucleolar. (24)

Otra clasificación utilizada para determinar el grado de intensidad de los enfermos con LES es establecida por la Organización Mundial de la Salud (OMS), la cual se basa en la anatopatología de la Glomerulonefritis (GN) (25) en donde la mayoría de los pacientes se pueden encuadrar en algunos de los siguientes grupos diagnósticos:

- * Clase I: Riñones normales.
- * Clase II: Alteraciones mesangiales.
- * Clase III: GN proliferativa focal y segmentaria y/o GN necrotizante.
- * Clase IV: GN proliferativa difusa y necrotizante.
- * Clase V: GN membranosa.

TRATAMIENTO.

Los medicamentos permitidos dependen del órgano o sistema involucrado, hay pacientes que con solo Acetaminofén o aspirina controlan su sintomatología.

El principio fundamental del tratamiento del LES consiste en suprimir las respuestas inflamatorias e inmunes mediante corticosteroides y los inmunosupresores ciclofosfamida y azatiopina en pronósticos desfavorables como la adolescencia, nefritis, alteraciones del SNC y pulmonares. En el LES severo el tratamiento se efectúa mediante la administración de metilprednisolona o ciclofosfamida por vía intravenosa; la dosis y duración del tratamiento depende de la gravedad de la enfermedad y el grado de respuesta. Los medicamentos antipalúdicos como la hidroxicloroquina o difosfato de cloroquina, reducen la actividad del LES y están especialmente indicados en las manifestaciones cutáneas y articulares.

Aunque en general es un síndrome crónico, es importante recordar que pasa por períodos de escasa o nula actividad en los que puede no hacer falta la medicación, sin embargo; más de la mitad de los enfermos fallecen por alteraciones renales o neurológicas en término de 10 años de haber iniciado su enfermedad. (26)

COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD (MHC)

El Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) es una región de genes polimórficos cuyos productos se expresan en las superficies de varias células. Este locus fue descubierto en la década de los 40s en la situación de los trasplantes de tejidos de un individuo a otro (ratones).⁽¹⁾

En el hombre, las proteínas producto de los genes del MHC se denominan Antígenos Leucocitarios Humanos (HLA); el MHC está ubicado en el brazo corto del cromosoma 6 y ocupa una región de 4000Kb. El producto de los genes del MHC tienen como función participar en el reconocimiento antigénico por parte de los linfocitos T, este proceso es en cierta manera complejo y se lleva a cabo por medio del reconocimiento de determinantes antigénicos en asociación con un antígeno propio, el cual es expresado por los genes del MHC.

Existen tres clases de genes del MHC: clase I, clase II y clase III, basados en sus estructuras, origen genético y función; las dos primeras codificadas por el sistema HLA y las últimas codifican para componentes del sistema de complemento. Los genes clase I están constituidos por tres loci: HLA-A, HLA-B, HLA-C, los genes clase II por el HLA-DR, HLA-DQ y el HLA-DP; y los de clase III incluyen genes que codifican para el C2, C4 de la vía clásica del complemento y el factor B de properdina (BF) de la vía alterna. También se encuentran los genes que codifican la 21-hidroxilasa A-B que intervienen en la biosíntesis del cortisol y los genes para el factor de Necrosis Tumoral α y β (fig. No. 1).

Todos estos genes del MHC son heredados en forma mendeliana codominante, por lo tanto, cada uno de los hijos expresa siempre un haplotipo paterno y otro materno. ^(1,2,8,40)

A).-MOLECULAS CLASE I.

Los genes clase I se localizan en un segmento de 2000Kb de DNA en el extremo telomérico del MHC humano, los cuales incluyen el HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-F, HLA-G y HLA-H. Los tres primeros antígenos son glucoproteínas de membrana que se expresan sobre todas las células nucleares del organismo, así como en las plaquetas, con excepción de los espermatozoides y las células trofoblásticas, que codifican para los principales antígenos de trasplantes humanos. Actualmente existen 41 alelos del locus A, 61 del locus B y 18 del locus C.

Los antígenos HLA-E,F,G,H son antígenos de diferenciación muy importantes en el desarrollo y la maduración fetal. El loci HLA-E codifica para una proteína de 336 aminoácidos, con un 67% de homología con HLA-A2, sintetizado por los linfocitos T, el loci HLA-F presenta las primeras 38 pb del exón 8 idénticas al HLA-A2, se transcribe en células linfoblastoides B. HLA-G es expresado en tejido corionico, con propiedades estructurales semejantes a las moléculas de clase I del ratón y juegan un papel importante en el mantenimiento del embarazo, mientras que el loci HLA-H aun es considerado un pseudogene.

Estas moléculas clase I funcionan como elementos de restricción, esenciales para el reconocimiento de los antígenos por los linfocitos T citotóxicos CD8. ^(5,8,9,10,9)

RECIBO CON
FOLIA DE ORDEN

* ESTRUCTURA DE LAS MOLÉCULAS DE CLASE I.

Estas moléculas están constituidas por dos cadenas, la cadena pesada o α (44KD), que es una glucoproteína polimórfica determinada por genes en el complejo HLA del cromosoma 6, unida por fuerzas no covalentes a una proteína no polimórfica de 12KD β 2-microglobulina, determinada por un gene del cromosoma 15.

La molécula entera está anclada en la membrana celular por la cadena α , la cual contiene 338 aa (aminoácidos) y puede dividirse en tres regiones, comenzando en el extremo amino. Una región esdrofilica extracelular (región de unión al péptido y región similar a las inmunoglobulinas) que abarca del aa 1 al 281, otra hidrofóbica transmembranosa (residuos 282-306) y la tercera hidrofílica citoplasmática (residuos 307-338). La región extracelular se divide en tres dominios denominados α 1, α 2 y α 3, que se componen de los residuos de a.a 1-90, 91-180 y 181-271 respectivamente (figura No. 2). (12-13)

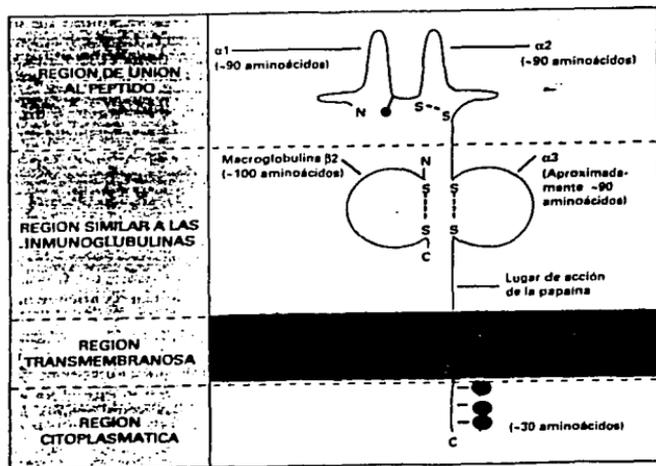


Figura No 2. Diagrama esquemático de la molécula de clase I del MHC. (12)

* REGION DE UNION AL PEPTIDO.

La porción de las moléculas de clase I que interaccionan con el antígeno proteico, consta de aproximadamente 180aa en el extremo amino terminal de la cadena α de clase I. El análisis de las secuencias de aminoácidos, ha indicado que esta región está formada por dos segmentos homólogos de unos 90aa, cada uno denominado $\alpha 1$ y $\alpha 2$. Cada molécula de clase I del MHC humano tiene un solo oligosacárido unido por enlace N cerca de la unión $\alpha 1$ y $\alpha 2$. El segmento $\alpha 2$ contiene un enlace disulfuro, que forma un asa de unos 63aa.

Los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ consisten de cuatro tiras β y una helice α que forman la porción superior.

Las ocho tiras β de estos dos dominios crean la plataforma β que actúa como soporte para las dos α hélices. Estas últimas construyen una hendidura de 25AX 10A X 11A que sirve como sitio de fijación de antígeno, el cual es procesado para dar lugar a fragmentos más pequeños que se unen a las moléculas del MHC y son reconocidas por los linfocitos T.

La mayor parte del polimorfismo de las moléculas clase I se localizan en las hélices α y en la porción de la plataforma β que estructura el piso de la hendidura. Por lo tanto, el sitio de fijación del antígeno varía de una molécula a otra. Esto sugirió que el polimorfismo entre los alelos del MHC de clase I sirve para crear variaciones en la superficie química de la hendidura que se une al péptido. Otros residuos polimórficos de las moléculas del MHC forman contactos con los receptores para el antígeno de las células T, lo que sugiere que las células T interaccionan de forma específica con los antígenos extraños asociados al MHC y con las moléculas propias del MHC.

Cada molécula del MHC contiene sólo un lugar para la unión del péptido y cada molécula del MHC se une a un solo péptido a la vez. La secuenciación de los aminoácidos de los péptidos recuperados de moléculas clase I, estableció tres características:

- 1.- Los péptidos unidos tienen una longitud entre 9 y 11aa. Once aminoácidos parecen ser el máximo tamaño que puede acomodarse dentro de la hendidura.
- 2.- Todos los péptidos aislados de una sola forma alélica de una molécula clase I, comparten características estructurales comunes.
- 3.- Las características compartidas por los péptidos aislados de una forma alélica, son diferentes de las compartidas por los péptidos aislados de otras formas alélicas.

Los análisis cristalográficos de las moléculas de clase I, han revelado que el lugar de unión al péptido contiene dentaciones que difieren entre los alelos de las moléculas de clase I y son complementarias de las características conservadas de los péptidos que se unen al alelo, lo que proporciona la base de la especificidad por el péptido (figura No. 3).⁽¹⁵⁾

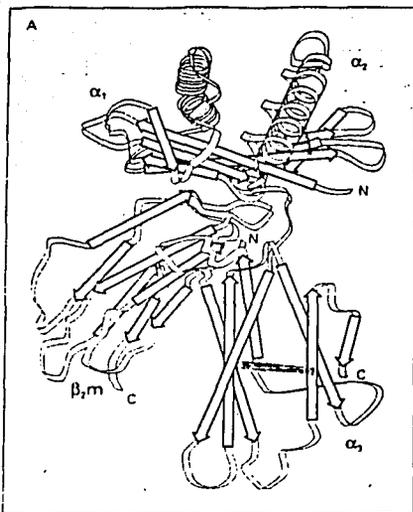


Figura No. 3. Patrón de plegamiento de los polipéptidos de una molécula clase I y región de unión. (3)

* REGION SIMILAR A LAS INMUNOGLOBULINAS.

El segmento α_3 de la cadena pesada se compone de unos 90 aminoácidos extracelulares entre el extremo carboxi terminal del segmento α_2 y la inserción de la membrana plasmática. La secuencia de aminoácidos de esta región está muy conservada entre todas las moléculas de clase I examinadas y, por análisis de secuencia, es homóloga a los dominios constantes de las Ig. El segmento α_3 contiene un asa similar a las Ig unida por enlace disulfuro.

La cadena β de las moléculas clase I, que está codificada por un gen fuera del MHC, es absolutamente invariable entre todas las moléculas de clase I humanas examinadas. Este polipéptido es idéntico a una proteína identificada previamente en la orina humana, llamada microglobulina β por su movilidad electroforética (beta 2), su tamaño micro y su solubilidad (globulina). A la cadena β de las moléculas de clase I se le llama habitualmente microglobulina β_2 , incluso cuando esta unida a la superficie celular. Como el segmento α_3 , la microglobulina es estructuralmente homóloga a un dominio constante de Ig y contiene un asa con un enlace disulfuro. De hecho, la estructura cristalina de HLA-A2 ha confirmado que tanto α_3 como la microglobulina β_2 se pliegan

FALTA DE ORIGEN
 1983/04/01

para formar dominios similares a los de las Ig, y por ello se consideran parte de la superfamilia de las Ig. Estos dos dominios interaccionan entre sí, y la microglobulina interaccionará además con la plataforma plegada β de la región de unión al péptido, formando un contacto extenso entre la microglobulina de $\alpha 1$ y $\alpha 2$, la interacción entre la microglobulina β y la cadena pesada $\alpha 1$ y $\alpha 2$ se refuerza cuando ambas interaccionan con el péptido: de manera similar, la interacción favorable de la microglobulina $\beta 2$, con la cadena pesada de clase I estabiliza la unión del péptido.⁽³⁾

* REGION TRANSMEMBRANOSA.

El polipéptido de la cadena α se extiende desde el segmento $\alpha 3$ a través de una región corta de conexión hasta un tramo de unos 25 aminoácidos hidrofóbicos. Se cree que esta región forma una hélice α que atraviesa la región hidrofóbica de la bicapa lipídica de la membrana plasmática y ancla la molécula del MHC a la membrana. Como con todas las proteínas transmembranas conocidas, la secuencia hidrofóbica termina en su extremo carboxi terminal con un grupo de aminoácidos básicos que se cree interrelacionan con los grupos de cabeza fosfolipídicos de la hoja interna de la membrana. Algunas aunque no todas, las cadenas pesadas de clase I contienen residuos cisteína dentro de la secuencia hidrofóbica que pueden modificarse mediante esterificación con el ácido mirístico. No se conoce el significado de está unión con un ácido graso.

El segmento hidrofóbico de una molécula de clase I no afecta a la conformación de las porciones extracelulares de la molécula, aunque están muy conservadas ciertas características específicas. Por ejemplo no se han encontrado alteraciones en la estructura o en las propiedades espectroscópicas de las moléculas clase I cuando se usa la enzima papaina para romper la región transmembrana de la porción extracelular. El tratamiento con papaina afecta a la solubilidad de la molécula; tras eliminar la región transmembrana, las porciones extracelulares de las moléculas de clase I son solubles en amortiguadores acuosos sin detergentes.⁽³⁾

* REGION CITOPLASMÁTICA.

El extremo carboxi terminal de las cadenas α de clase I contienen aproximadamente 30 a.a.; esta región se cree que está localizada en el citoplasma. La secuencia global de esta región no se conserva entre las diferentes moléculas clase I, aunque si lo hacen algunas características específicas. por ejemplo, todas las moléculas α de clase I contienen aminoácidos que forman lugares de fosforilación para la proteína cinasa dependiente de la monofosfato adenosina cíclica (AMPc) y para la tirosin cinasa. El extremo carboxi terminal de todas las moléculas de clase I conocidas sufren una fosforilación endógena en todavía un tercer lugar conservado. Además, todas las cadenas pesadas de clase I contienen en su extremo carboxi terminal una glutamina que es el sustrato apropiado para la transpeptidación por la enzima transglutaminasa. El significado funcional de esta característica estructural es desconocido, pero puede actuar en la regulación de la interacción de las moléculas clase I, con otras proteínas

de membrana o con elementos de citoesqueleto. Además se ha visto que la eliminación de porciones del extremo carboxi terminal inhiben la internalización de las moléculas de clase I, lo que implica directamente a la región carboxi terminal.⁽¹⁾

B).-MOLECULAS DE CLASE II.

Los genes clase II se localizan en el extremo centrométrico del brazo corto del cromosoma 6, en un segmento de 1,100Kb. Está región incluye los loci HLA-DR, DQ, DP, y cada uno de estos contienen genes A y B que codifican para una cadena α y otra β , unidas de manera no covalente que dan lugar a la expresión de una proteína dimérica llamada antígeno clase II. Otros genes de la región, DZ, DO, DX, son pseudogenes, que nos se ha detectado sus productos de expresión, solo se conoce que la subregión DZ contiene un solo gene HLA-ADN y la región DO un gene HLA-DOB. No se han encontrado que estos se expresen in vivo, aunque sí in vitro.

Estos antígenos se expresan sólo en macrófagos, linfocitos T activados, linfocitos B, células dendríticas, epiteliales, de Langerhans, células de Kupffer y células microgliales, en donde funcionan como elementos de restricción para el reconocimiento de los linfocitos T cooperadoras CD4.

Actualmente existen 21 alelos HLA-DR; 9 HLD-DQ y 6 HLA-DP (Ver fig. 1).^(1,2,3,4)

*** ESTRUCTURA DE LAS MOLECULAS DE CLASE II.**

Cada molécula clase II es un heterodímero formado por dos cadenas glucoproteínicas, una cadena α (32-34 KD) y una β (29-32 KD) unidad por fuerzas no covalentes. La cadena α es algo mayor debido a una glucosilación más extensa. En las moléculas de clase II, ambas cadenas polipeptídicas contienen grupos de oligosacáridos unidos por enlaces N, un extremo amino terminal extracelular y un extremo carboxilo terminal intracelular.

Estas moléculas presentan cadenas $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\beta 1$, $\beta 2$. La cadena β es la más polimórfica, especialmente la beta 1, aunque en las moléculas DQ y DP la cadena α sí es polimórfica y contiene dos residuos de hidrato de carbono, un polímero de manosa y un glicano en los aminoácidos 78 y 118 respectivamente. La cadena β posee un oligosacárido de tipo complejo en el aa 19.

Las cadenas α y β se componen de 229 y 237 aminoácidos respectivamente. Igual que la cadena pesada clase I, están constan de tres regiones: una región hidrofílica extracelular (región de unión al péptido y región similar a las inmunoglobulinas), una hidrofóbica transmembranosa y una hidrofílica intracelular. La región hidrofílica extracelular de la cadena α contiene dos dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ (residuos de a.a 1-84 y 85-178). La región hidrofílica de la cadena β contiene dos dominios $\beta 1$ y $\beta 2$ (1-91 y 92-192 aa). Los dominios $\alpha 2$ y $\beta 2$ muestran homología significativa con las regiones constantes de las inmunoglobulinas.

Las características estructurales de las moléculas DQ y DP son análogas a las DR. Las cadenas α y β tienen 234 y 229 aa; en tanto que las DP α y β poseen cada una 229 aa. (ver figura No 4).^(1,2,4,5)

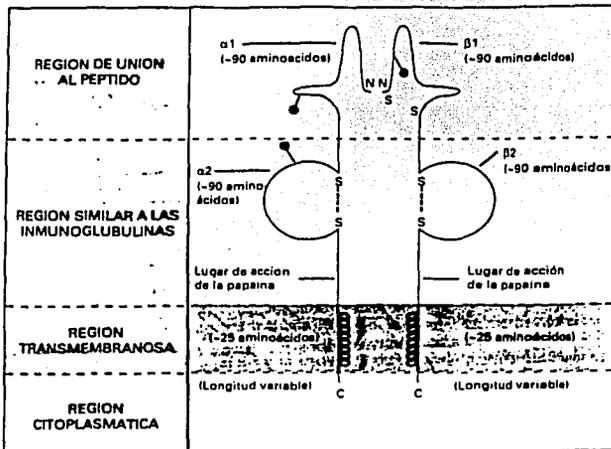


Figura No 4. Diagrama esquemático de una molécula clase II de MHC. (3)

* REGION DE UNION AL PEPTIDO.

Las porciones extracelulares de las dos cadenas α y β se han subdividido en dos segmentos de unos 90 aminoácidos cada uno, llamados $\alpha 1$ y $\alpha 2$ ó $\beta 1$ y $\beta 2$ respectivamente. La región de unión al péptido de las moléculas clase II se forman de una interacción de ambas cadenas que implican a los segmentos $\alpha 1$ y $\beta 1$. Esto es diferente de las moléculas de clase I, en las que sólo la cadena α está implicada en la formación de la hendidura de unión al péptido.

De manera más específica, $\alpha 1$ y $\alpha 2$ se pliegan para formar una plataforma plegada en β de ocho bandas que apoya a dos hélices α ; cuatro de las bandas de la hoja plegada en β y una de las hélices α , están formadas por $\alpha 1$, mientras que las otras cuatro bandas y la otra hélice α están formadas por $\beta 1$.

El $\alpha 1$ de clase II como el de clase I, no contiene un asa con enlace disulfuro, mientras que sí la contiene el $\beta 1$ de clase II (como el $\alpha 2$ de clase I); el asa del $\beta 1$ de clase II está en la misma posición que el asa α de clase I. Como en la estructura de la clase I, la estructura de clase II utiliza hélices α y bandas β para formar los lados y el suelo, respectivamente, de la hendidura de unión al antígeno. Al contrario que la clase I, los extremos de la hendidura de la clase II están abiertos, lo que permite a los péptidos unidos extenderse fuera de la misma.

De hecho los péptidos recuperados de moléculas de clase II purificadas tienen una longitud de 10 a 30 ó más a. a, con un tamaño medio de 14 aminoácidos.

TESTES COM
 FALTA DE ORIGEN
 NEGATIVO

Como en el caso de las moléculas de clase I los residuos polimórficos de las moléculas de clase II están concentrados en $\alpha 1$ y $\beta 1$, situados en los lados de la hélice α y en el suelo de la hoja plegada en β , de la hendidura de unión al péptico, con sus cadenas laterales al interior de la hendidura o hacia la parte superior de las hélices. De este modo, como en las moléculas de clase I, el polimorfismo genético de las moléculas clase II determina la superficie química de la hendidura y es el determinante principal de la especificidad, afinidad de unión al antígeno y del reconocimiento de la célula T.⁽³⁾

*** REGION SIMILAR A LAS INMUNOGLOBULINAS.**

Los segmentos $\alpha 2$ y $\beta 2$ de las moléculas de clase II contienen enlaces disulfuro internos y secuencias de aminoácidos que pertenecen a la superfamilia de las Ig. Ahora se sabe que estos segmentos, como las $\alpha 3$ de clase I y la microglobulina $\beta 2$, están en realidad plegados en dominios de Ig dentro de la molécula del MHC nativa. Los segmentos $\alpha 2$ y $\beta 2$ de clase II son esencialmente no polimórficos entre los diferentes alelos de un gen de clase II en particular, aunque muestran algunas diferencias entre los diferentes loci genéticos. De esta forma, las regiones $\alpha 2$ de todos los alelos DR son similares, pero DR $\alpha 2$ difiere de DP $\alpha 2$ y DQ $\alpha 2$: Se ha propuesto que la correlación de la expresión de CD4 en las células T con la especificidad para las moléculas de clase II del MHC surge de la unión de la molécula CD4 con el dominio $\beta 2$ no polimórfico de las moléculas de clase II.

Las regiones similares a las inmunoglobulinas de las moléculas de clase II son probablemente importantes para las interacciones no covalentes entre las dos cadenas, aunque sin duda otras porciones de las cadenas contribuyen también. Estas interacciones son muy fuertes y pueden romperse sólo mediante condiciones desnaturalizantes intensas.⁽³⁾

*** REGION TRANSMEMBRANOSA Y CITOPLASMATICA.**

Los extremos carboxi terminales de los segmentos $\alpha 2$ y $\beta 2$ se extienden en cortas regiones de conexión, seguidas de bandas de aproximadamente 25 aminoácidos hidrofóbicos, que probablemente cruzan la membrana. La acción de la papaina puede separar las porciones extracelulares de la molécula de la región transmembranosa sin pérdida de la estructura. En ambas cadenas, la región transmembranosa hidrofóbica termina con un grupo de aminoácidos básicos, estos se continúan con una cola citoplasmática hidrofílica corta, que forma el extremo carboxi terminal de los polipéptidos.⁽³⁾

*** SUBREGION HLA-DR.**

La subregión DR contiene un sólo gen HLA-DRA. El número de genes DRB varía con el tipo de DR, pero la configuración más común tiene tres genes DRB, designados

DRB1, DRB2 y DRB3 (DRB4). Una subregión DR contendrá DRB3 o DRB4, pero no los dos. DRB2 es un pseudogen, es decir no se expresa. El producto del gen DRA, o sea la cadena DR α , puede combinarse de manera individual con productos de los genes DRB1 y DRB3 (o DRB4), las cadenas DR β 1 y DR β 3, para producir dos moléculas DR distintas, DR α β 1 y DR α β 3 (o DR α β 4). La cadena DR α no se comporta como polimórfica virtualmente, no así las cadenas DR β cuyo polimorfismo es elevado, por lo tanto es la responsable de la determinación del antígeno DR. Las moléculas DR α β 1 portan las especificidades DRw52 y la molécula DR α β 4 porta DRw53. En general, DRw52 y DRw53 se relacionan con subconjuntos particulares de especificidades DR, DR1-DRw18.⁽¹⁾

* SUBREGION HLA-DQ.

La subregión DQ contiene dos conjuntos de genes: DQA1, DQB1 y DQA2, DQB2, los dos últimos son pseudogenes. Como productos de los genes DQA1 y DQB1, las cadenas DQ α y DQ β se combinan para formar las moléculas DQ α β . Al contrario de las moléculas DR, las cadenas DQ α y β son ambas polimórficas. Sin embargo, aparentemente la cadena DQ β es el determinante mayor del tipo o el antígeno DQ. Las moléculas DQ α β portan las especificidades DQw1-DQw9. Debido a que cada individuo tiene dos subregiones DQ, una en cada uno de los dos cromosomas 6, y dado que los genes DQ se expresan en codominancia; el hecho de que las dos cadenas α y β , de la molécula sean polimórficas, permite a los sujetos heterocigotos para DQ (es decir, que tienen dos genes DQA1 y dos genes DQB1 diferentes) expresar, cuatro moléculas DQ distintas por apareamiento cis y trans. Apareamiento cis se refiere a la relación de las cadenas α y β , determinadas por los genes del mismo cromosoma; y el apareamiento trans se refiere a la reunión de cadenas α y β codificadas, respectivamente, por genes de cromosomas opuestos. Las moléculas formadas por apareamiento trans se denominan también moléculas híbridas y pueden tener importancia en las relaciones de HLA y enfermedad.⁽¹⁾

*SUBREGION HLA-DP.

La subregión HLA-DP también contiene dos conjuntos de genes: HLA-DPA1, DPB1 y HLA-DPA2, DPB2; estos dos últimos son pseudogenes. Los genes HLA-DPA1 y DPB1 determinan las cadenas DP α y β , respectivamente, que se combinan para formar la moléculas DP α β 1. La cadena DP α despliega un polimorfismo limitado, en tanto que las cadenas DP β es muy polimórfica y, al parecer, determina el antígeno o el tipo DP. Debido a que las dos cadenas, α y β son polimórficas, puede producirse apareamiento cis y trans, que conduce a la formación de cuatro moléculas distintas en los heterocigotos. Las moléculas DP portan los antígenos DPw1-DPw6.⁽¹⁾

C).-MOLECULAS CLASE III.

Los genes clase III se encuentran ubicados en una porción de 120Kb entre los genes clase I y teloméricos a la región de clase II; a unas 300Kb de HLA-DR y a 650Kb de HLA-B.

Estos genes se heredan como unidad genética a la que se denomina como "complotipo" (por haplotipo del complemento). Cada complotipo codifica la síntesis de los factores del complemento C2, C4A y C4B de la vía clásica y el factor B properdina de la vía alterna; que son homólogas a las proteínas séricas S del MHC del ratón. Intercalados entre los genes C4A y C4B se localizan 2 genes que codifican para la expresión de la enzima 21-hidroxilasa (21-OH), la cual hidroxila el carbono 21 en la biosíntesis del cortisol.

En esta región existen otros genes con funciones inmunológicas, que al parecer participan en algunos pasos de la fisiopatogenia de las enfermedades autoinmunes. Hacia el centrómero de la región clase II se encuentran los genes TAP1 y TPA2, así como el gene de la colagena. Los genes TAP1 y 2, llamados transportadores en el procesamiento del antígeno 1 y 2, codifican subunidades de una bomba proteica heterodimérica que transporta peptidos desde el citosol al réticulo endoplásmico, donde pueden asociarse a cadenas pesadas del MHC de clase I recién trasladadas.

Centromérico a la región clase I se localizan los genes: HSP70 y el factor de necrosis tumoral TNF alfa y beta a unas 250Kb de HLA-B.^(1, 3, 5, 8, 40)

MHC ASOCIADO CON ENFERMEDADES.

La asociación de los genes del MHC con una enfermedad se demostró primero en ratones en el año de 1964, donde un tipo de leucemia inducida por virus resultó estar asociada con el genotipo H2, de una cepa especial de ratones. Esta asociación de un marcador genético con una enfermedad, llevó entonces a buscar asociaciones entre los fenotipos HLA y las enfermedades en los seres humanos. En 1973 se informó la asociación entre espondilitis anquilosante y el antígeno HLA-B27. Desde entonces numerosas enfermedades han sido reportadas, relacionadas con los genes del MHC, por ejemplo hemocromatosis idiopática vinculada a HLA-A3, artritis reumatoide HLA-DR4, síndrome de Sjögren a DRw52 etc.^(8, 1, 40, 13)

Gran parte de padecimientos se han relacionado con antígenos clase II (DR), y esta asociación refleja con certeza, la función de las moléculas clase II en la presentación a linfocitos TCD4, de fragmentos antigénicos procesados.

Se han usado estudios de población abierta y familiares para demostrar la relación entre genes marcadores dentro del complejo HLA y varias enfermedades. En los estudios en población abierta, las frecuencias antigénicas HLA de un grupo de controles se comparan con las frecuencias obtenidas de un grupo de pacientes enfermos. En los estudios familiares se investiga si el gen de susceptibilidad a la enfermedad se hereda dentro de la familia, ligado aun haplotipo HLA.

Se han enunciado varias hipótesis para explicar la relación entre HLA y enfermedad, como son:

A.- Las moléculas HLA son receptores de agentes etiológicos, como virus, toxinas u otras sustancias extrañas, que pueden afectar a un individuo en su capacidad de producir una respuesta inmune. Por otra parte, dichos agentes pueden producir alteraciones en las moléculas HLA capaces de ser detectadas por el sistema inmunológico y conducir a una respuesta autoinmune contra las células alteradas capaz de generar una enfermedad.

B.- El HLA es selectivo para antígenos peptídicos procesados que en última instancia causan la enfermedad.

C.- El receptor de la célula T determina la predisposición a la enfermedad.

D.- Los agentes causales imitan a las moléculas HLA; el antígeno HLA relacionado con enfermedad se comporta inmunitariamente igual al agente causal de la enfermedad. Esta hipótesis de imitación molecular tiene dos alternativas; la primera sostiene que debido a la semejanza del agente causal y el antígeno HLA, se considera como propio y no se monta una respuesta inmunitaria, desarrollándose la enfermedad sin interferencia del sistema inmunitario del huésped; la segunda alternativa sugiere que el agente causal se considera como extraño y, por lo tanto, se desarrolla una respuesta inmunitaria vigorosa contra él. Debido a la semejanza entre el agente causal y el antígeno HLA, la respuesta inmunitaria se vuelve contra el antígeno HLA, y este proceso autoinmunitario causa el trastorno.

E.- La expresión de moléculas MHC clase II es aberrante. Postula que la inducción de moléculas clase II, que normalmente no se expresa en la superficie celular, causa la enfermedad. Las moléculas específicas de tejidos de la superficie celular están en recambio y degradación constante. Si las células no expresan moléculas clase II, la degradación del antígeno a péptidos adecuados no tiene consecuencias. Sin embargo si las células blanco son inducidas a expresar moléculas clase II, la degradación de estas sustancias específicas de tejido, conducirían a procesamiento del antígeno. Un fragmento peptídico de la molécula específica de tejido se uniría al sitio fijador del antígeno en el receptor clase II, formando así un complejo inmunógeno que iniciaría una respuesta del huésped contra la molécula específica de tejido.

F.- Deficiencia de los antígenos clase III. Estas deficiencias confieren predisposición genética a enfermedades semejantes al lupus, estas deficiencias incluyen C1, C2 y

C4. (1,2,3,5,8,40)

ASOCIACION DE ANTIGENOS CLASE I Y II CON LES.

El primer estudio de un marcador genético de LES fué realizado por Drumet en 1971, quien menciona el alelo clase I HLA-B8 asociado a LES. Estudios posteriores describen incrementos en las frecuencias de alelos clase II HLA-DR2 y DR3, que muestran un desequilibrio de unión con B8, asociaciones de alelos nulos C4A, ligado a DR3 en pacientes blancos conferido por una delección de 30Kb de ADN en la región clase III, alrededor del gen C4 y el pseudogene 21 hidroxilasa A (CYP21A). Así como el

haplotipo HLA-B8, SC01, DR17 ó DR3, DR2 en pacientes con LES. En varios estudios en donde se emplearon tipificaciones serológicas, se demostró que HLA-DR3 y en menor grado HLA-DR2, se encuentran fuertemente asociados con anticuerpos anti-Ro y anti-La. Además la combinación heterocigota de HLA-DQ1 y DQ2, las cuales muestran desequilibrio de unión con DR3 y DR2, respectivamente, correlacionan con niveles séricos altos de anti-Ro y La. Se ha hipotetizado que esta combinación heterocigota de DQ puede representar un ejemplo de complementación génica transalélica. En algunos estudios se demostró que las cadenas DQ α como DQ β son codificadas por haplotipos opuestos trans y que pueden aparearse para formar un heterodímero híbrido sobre la superficie celular, de esta manera se puede explicar la fuerte predisposición a presentar niveles altos de autoanticuerpos Ro y La, conferidos por el estado heterocigoto de DQ1/DQ2. (15, 20, 44, 33)

Las moléculas del MHC forman un complejo trimolecular conjuntamente con el péptido procesado y el TCR (receptor de las células T). Los dominios externos de las moléculas de clase II contienen tres regiones hipervariables polimórficas que forman la hendidura donde puede unirse el péptido procesado y es presentado a los linfocitos T cooperadores (TH) mediante su TCR. De esta manera las moléculas de clase II restringen la respuesta específica de las células TH. En contraste las moléculas del MHC clase I restringen la respuesta específica de las células T citotóxicas (TC). Bajo circunstancias normales, un autoantígeno que se une a una molécula del MHC no debe inducir una respuesta inmune cuando es presentada a una célula TH. En el LES ciertos autoantígenos, de naturaleza aún no bien definida pueden iniciar y perpetuar una respuesta autoinmune. Este tipo de respuestas parecen ser antígenos específicas y dependientes de linfocitos T. El polimorfismo encontrado en el sitio de unión al antígeno de las moléculas del MHC clase II es la base de su asociación con enfermedad, el cual debe jugar un importante papel en el fenómeno de autoinmunidad. (3)

Sin embargo la distribución de los antígenos HLA es diferente de acuerdo a las razas, como se observa en los estudios efectuados por Kameda et col. en Japón, donde 116 pacientes con LES tienden asociarse con HLA-DR2, pero no con DR3, como sucede en pacientes caucásicos observado por Schur en 1990, encontrando una fuerte asociación de DR3 con el alelo nulo C4A*QO, presente en haplotipo extendido HLA-B8, SC01, DR3 (SC01 denotado BF*S, C2*C, C4A*QO, C4B*1). (42, 41)

Zdenka Franck en 118 pacientes norteamericanos blancos usando RFLP, sugiere que los genes HLA-DR2 y DQ1, especialmente el alelo raro DQB1. AZH (DQB1*502) confieren un riesgo relativo alto (RR=14) en pacientes con LES, que llegan a desarrollar nefritis durante la enfermedad, así como una disminución de DR4, lo cual sugiere un efecto protector de este antígeno en el desarrollo de la enfermedad. Otro estudio correlaciona la deficiencia homocigota de C2 en pacientes con LES ligado a los antígenos HLA-B8 y HLA-DR2 con un RR=7.4. (29, 30, 31, 41, 42, 80)

Otros genes como HLA-DR15 y DQ1 son significativamente más frecuentes en pacientes con LES del sur de China (RR=5.2), pero la posesión de alelos nulos C4 ligado al antígeno DR15 confieren el mayor riesgo RR=8.3, lo cual sugiere que la susceptibilidad a LES tiende al extremo telomérico del locus DR. (44)

Algunos estudios han mostrado que los alelos HLA clase II se asocian principalmente con ciertos anticuerpos y no propiamente con la enfermedad, como los alelos DQ (HLA-DQA1, HLA-DQB1) son importantes factores de riesgo para el desarrollo de autoanticuerpos Ro(SS-A)/ La(SS-B). Estos alelos DQ comprenden DQw2.1 (DQA1*501, DQB1*201) y DQw6 (DQA1*06), los cuales presentan una gran variedad de haplotipos diferentes HLA-DR3 y DR2, como son DQB1*302 y DQA1*0401. Análisis de las secuencias de nucleótidos asociados a los alelos DQ mostraron que los alelos DQA1 poseen glutamina en la posición 34 y los alelos DQB1 leucina en la posición 26, que al parecer constituyen un requerimiento mínimo para el desarrollo de la respuesta autoinmune.

Otros alelos DQB1*201, DQB1*0602 y DQB1*302 (DQw6) se asocian con niveles altos de anticuerpos anti-DNAc. (27,53,54,55)

Olse et al. realizaron un estudio con Polimorfismo en los Fragmentos Largos de Restricción (RFLP) en pacientes con LES, encontrando una fuerte asociación de anticuerpos anti-sm ligado al antígeno DQw6 y anticuerpos anti-nRNP asociado a HLA-DQw5 y DQw8. Estos alelos comprenden las secuencias DQA*0102(DQw6), las cuales difieren de DQA1*101 (DQw5) en la posición 34, glutamina por ác. glutámico. En contraste la cadena DQB1*602 en la posición 57 contiene el aa ác. aspártico asociado a anti-sm, mientras que DQB1*0501(DQW5) posee un a a neutro valina ó alanina en la posición 57 asociado al desarrollo de anticuerpos anti-nRNP, lo cual indica que tal vez el alelo DQB1 muestra un aa, ác. aspártico en la posición 57, el cual confiere resistencia a desarrollar anticuerpos anti-nRNP, mientras que el encontrar un aa neutro confiere susceptibilidad. (56)

Otros anticuerpos asociados a los antígenos HLA clase II son los anticuerpos antifosfolípidos (APAS), que se encuentran aproximadamente en el 34 al 44% de los enfermos. Mc Neil encontro un aumento del antígeno DR4 y DR7 en pacientes de la Gran Bretaña y Australia con LES asociado a APAS. Ambos alelos se encuentran en desequilibrio de enlace con el alelo HLA-DRB4 ,DRw53 (DRB4*0101), lo que sugiere que DRw53 puede tener una asociación primaria con la enfermedad. (19, 20)

La localización de las secuencias críticas que confieren susceptibilidad a la enfermedad ha sido difícil debido a que:

1.- Existen tres regiones clase II (DR, DQ, DP) cuyos locus se encuentran muy cercanos, especialmente DR y DQ, presentándose un amplio desequilibrio de unión.

Todos estos locus α y β del MHC clase II muestran un polimorfismo alélico variable excepto para el gen DR α (DRA), pero los genes DR β (DRB1, DQB1, DPB1) son los más polimórficos. De esta manera la asociación con una enfermedad por ejemplo DR3 puede presentar una secuencia de susceptibilidad en los alelos DRB1 (DR3) o DR β 3 (DRw52) o en los alelos adyacentes como DQB1*0201 ó DQA*0501. Afortunadamente estos mismos HLA-DR y HLA-DQ pueden presentarse en diferentes combinaciones haplotípicas, especialmente en otros grupos étnicos.

2.- Las mismas secuencias polimórficas pueden ser codificadas por diferentes alelos HLA. Es decir que los alelos HLA muestran secuencias que difieren dentro de los distintos alelos, las cuales deben ser examinadas cuando se busca susceptibilidad para alguna enfermedad. Finalmente, si se ha delineado una respuesta autoinmune homogénea es probable que la secuencia de susceptibilidad pueda explicar la

respuesta de todos o casi todos los pacientes. Esta estrategia se ha aplicado a buscar asociación de antígenos HLA con la aparición de subgrupos de anticuerpos en LES. (17,15,37)

Granados y col. en estudios realizados a pacientes mexicanos con LES, encontró una fuerte predisposición de este síndrome con los antígenos HLA A30, DR3 y DR7, asociados con alelos nulos C4A de la región clase III. (23)

El análisis por haplotipos mostró que el haplotipo característico de los pacientes con LES es el DRB1*0407, DQA*03, DQB*302, en particular el gen de la cadena DRB1 se complementa con los alelos del gen de las cadenas DQA y DQB, en algunos haplotipos de la cadena DRB puede ser aportada por un origen étnico, mientras que las cadenas del locus HLA-DQ son aportadas por otro grupo étnico, constituyendo de esta manera el híbrido característico del mestizo mexicano que lo hace particularmente susceptible al desarrollo del LES. De esta la asociación con LES del antígeno DR3 puede presentar secuencias de susceptibilidad en los alelos DRB1 o DRB3 o en los alelos adyacentes como DQB1*0201 o DQA1*0501. (20,41)

ASOCIACION DE ANTIGENOS CLASE III CON LES.

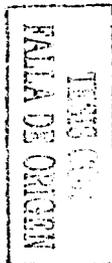
* DEFICIENCIA DE C2.

C2 es una glicoproteína de cadena sencilla con un PM de 102 KD, la cual circula en la sangre como pro-enzima. Esta serín-proteasa esta compuesta por 732 aa y es codificada por un ARNm de 2.9Kb, el gen tiene una longitud de 18Kb; C2 es sintetizada en el hígado y células de la serie monocitica/macrófago, inducida su síntesis por el interferon γ .

En la vía clásica en presencia de C1s, C2 se une a C4b y se fragmenta en C2B (PM 30,000) y C2A (PM70,000) que posee el sitio enzimático.

El polimorfismo en C2 ha sido definido por corrimiento isoeléctrico en gel de poliacrilamida y extensión de la función hemolítica, con eritrocitos sensibilizados y suero deficiente en C2. Determinando cuatro alelos, un alelo común C2' o C2C que produce 4 bandas de lisis ácidas; un segundo alelo C2² o C2B produce una serie de bandas similares, más básicas. Estos alelos se presentan en caucásicos, orientales y negros con una frecuencia del 3-7%. El tercer alelo C2³ o C2A son bandas más ácidas, las cuales han sido reportadas en japoneses y un alelo deficiente raro C2*QO. Aunque la mayor parte de los individuos son homocigotos para el alelo C2C con una frecuencia de 0.97, C2B se observa con una frecuencia de 0.034 y C2A de 0.022. Actualmente se han reportado 4 variantes ácidas raras y 3 variantes básicas más. (11,11,15,50,22)

La deficiencia de C2 es más frecuente en hombres, con una incidencia estimada de 0.0025% en población normal. En los casos estudiados de LES la deficiencia heterocigota de C2 se encontró en el 6% de los pacientes, mientras que en la forma homocigota se encontró que cerca de la tercera parte de los individuos presentan n síndrome semejante al LES. Los pacientes deficientes de C2 pueden presentar además dermatomiositis, vasculitis y púrpura de Henoch-Scholein.



Existen dos tipos de deficiencias relacionadas a C2: tipo I debida a un defecto en la traducción de ARNm, en donde la ausencia de ARNmC2 en monocitos de pacientes con LES, sugiere que la deficiencia de C2 es un defecto en el proceso de transcripción o post-transcripción del ARNm, el cual se encuentra asociado al haplotipo HLA-B8, DR2, Bf*S, C2*QO, C4A*4,C4B*2, lo cual sugiere que la mayoría de los pacientes presentan la misma mutación en el 94% de los casos de pacientes con LES. Deficiencia tipo II o de tipo bioquímico, resultado de un bloqueo selectivo de C2. (29,37,38) Sullivan en 1993 reportó una mutación en pacientes que mostraban deficiencia tipo I: Esta mutación consiste en una delección de 28pb la cual provoca la terminación prematura de la transcripción, por lo que el alelo mutado no es capaz de producir la proteína activa, esta mutación es responsable del 90% de los casos de alelos nulos C2 en norteamericanos con LES. Esta mutación también ha sido encontrada en pacientes afro-americanos con LES, asociada al alelo DRB*1501. (37)

• DEFICIENCIA DE C4.

El C4 es una molécula de 200KD, que consiste de 3 subunidades una alfa (95KD), beta (75KD) y una gama de (30KD), unidas covalentemente por puentes disulfuro. La molécula C4 es sintetizada por un ARNm de 5.6 Kb, en el orden beta-alfa-gama. La pro-C4 es un polipeptido de 1722 aa, que circula en la sangre como pro-enzima, siendo glicosilada y cortada proteolíticamente en las regiones ricas en arginina intracelularmente, una vez secretada es procesada en el plasma por eliminación de un fragmento de 5KD del carboxilo terminal de la cadena alfa, para dar lugar a la molécula biológicamente activa.

El componente C4 es el único que es codificado por dos genes denominados C4A y C4B, estos genes presentan una alta homología 99%. Todos los genes C4A poseen una longitud de 22Kb, a diferencia de C4B con una longitud de 6.5Kb debido a la pérdida de un intrón en el extremo 5'. La cadena alfa de C4A es escasamente mayor en PM que C4B (96KD en comparación de 94KD), y el número de a.a en las dos clases de cadenas es el mismo, por lo cual la diferencia aparente en el peso reside en su configuración, lo cual confirma la homología del 99% entre C4A y C4B.

C4A y C4B son ambos loci altamente polimórficos con más de 35alelos, incluyendo alelos nulos C4*QO en ambos loci. El polimorfismo ha sido definido por electroforesis en gel de agarosa en alto voltaje e inmunofijación con anti-C4 humano, por serología de determinantes antigénicos Rodgers (Rg) y Chido (Ch), por estudio de activación de complemento y PCR. (6,12,17,24,27,47,27)

Como el locus C4 esta en realidad duplicado; C4A (determinate Rg) determina el grupo más ácido en la electroforesis, mientras que C4B (determinate Ch) determina el grupo más básico. Las variantes C4B son más vistas por su elevada actividad hemolítica, que las variantes C4A. Esto es debido a una importante diferencia en la reactividad del enlace tioéster interno formado entre un residuo de cisteína y una glutamina, que permite a C4A reaccionar con grupos aminos, mientras que C4B

reacciona con grupos amino e hidroxilo, presente en glóbulos rojos de carnero sensibilizados, ricos en grupos hidroxilo, lo que explica su elevada actividad hemolítica. (12, 33, 45, 46)

Al respecto O'Neill et al observaron cuatro patrones de bandas anodales de movimiento rápido (F) denominadas C4A, 4 bandas catodales de movimiento lento (S) C4B y una combinación de ambas. Estas bandas mostraron desigual concentración del tñido, siendo más claras las variantes S, que las F.

Awdeh et Teisberg, reportan una asociación positiva entre C4F y C4S con HLA-B12 y HLAB8 respectivamente. (48, 49)

Los alelos son acordados al número y a la posición relativa de las bandas más ácidas: El alelo con las bandas más ácidas cercanas al catodo es numerado como C4A1 o C4B1. Actualmente se han identificado 13 alelos C4A y 22 alelos C4B con sus respectivos alelos nulos. (21, 43)

La deficiencia heterocigota de C4 tanto para C4A y C4B ocurre en 10% a 15% en pacientes blancos con LES y confiere un riesgo relativo de 10 a 20. La deficiencia parcial ocurre en 50 a 80 % de los pacientes con LES y confiere un riesgo relativo de 2 a 4%. Los alelos nulos de C4A se han asociado a LES en diversas poblaciones étnicas, las cuales incluyen blancos americanos, ingleses, australianos, negros americanos, chinos, japoneses y meztizos mexicanos. Los alelos nulos de C4B se han descrito como factor de riesgo para LES en poblaciones de chinos, aborígenes australianos y negros americanos. (12, 15, 16, 18, 36, 39, 42, 23)

Análisis estructurales de genes C4 han revelado que solo una proporción de alelos nulos C4 resultan de deleciones que afectan en total al gen C4, y adyacentemente al gen 21-OH, como la deleción de 30 Kb de la región clase III alrededor del gen C4 y del pseudogen 21-hidroxilasa A(CYP21A); la cual esta usualmente ligada al antígeno HLA-DR3 en pacientes blancos. Consecuentemente otros alelos nulos son genes no expresados (pseudogenes) ó son resultado de la conversión de genes C4A a C4B ó viceversa. (21, 49)

Inicialmente la deficiencia de C4 fue asociada a un desequilibrio de unión con DR3, en poblaciones caucásoides asociado al haplotipo A1, B8, C4A*Q0, C4B1, DR3. Sin embargo estudios posteriores encontraron que la asociación de C4*Q0 con LES es independiente de DR3 en ciertos grupos étnicos; como lo muestran los estudios realizados en japoneses donde el alelo nulo C4 constituye un factor de riesgo para LES pero no el alelo DR3. (15, 42)

Análisis en Southern Blot de varios C4A*Q0 han demostrado que la deleción de 30 Kb de DNA en la región clase III cerca de la posición 5' del gen C4A y del pseudogen 21-OH, se presenta en el haplotipo extendido HLA-B8, DR3, C4A*Q0, C4B1 en caucásicos. Mientras que el alelo C4B*Q0 se ha encontrado asociado al haplotipo HLA-B44, C2*C, B*5, C4A*3, C4B*Q0, DR6. (17, 41, 47)

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

De gran importancia resulta la determinación de los Antígenos Leucocitarios Humanos (HLA) en el transplante de órganos, medicina forense, pruebas de paternidad y marcador genético de susceptibilidad a enfermedades autoinmunes como el Lupus Eritematoso Sistémico, un síndrome que afecta principalmente a mujeres en edad reproductiva entre los 12 y los 40 años de edad, con una incidencia en familias mestizas mexicanas de un caso por cada 2500 personas.

El LES es el más representativo de los procesos autoinmunes y el más complejo desde el punto de vista clínico; ya que tiene una gran variedad de patrones de expresión, que pueden afectar cualquier órgano, con periodos de actividad e inactividad. Su carácter de síndrome en el que caben etiologías, fisiopatologías y pronósticos diferentes en que puede manifestarse, requieren la aplicación de un cuidadoso estudio diagnóstico. Por lo que se buscan las asociaciones de antígenos o haplotipos HLA que confieran susceptibilidad a desarrollar LES. Mediante un estudio en población abierta que se llevo a cabo en el Hospital Juárez de México (HJM), con la finalidad de establecer un diagnóstico más específico a LES en pacientes susceptibles

4. OBJETIVOS.

- * Tipificar los antígenos HLA clase I y II en mujeres con LES por la técnica de microlinfocitotoxicidad, para encontrar un marcador genético.
- * Determinar la frecuencia de los Antígenos Leucocitarios Humanos (HLA), en los pacientes con LES que acuden al Hospital Juárez de México.
- * Calcular el Riesgo Relativo (R.R) de los antígenos en la población de enfermos con LES.

5. HIPOTESIS.

El Lupus Eritematoso Sistémico es una enfermedad asociada con el sistema HLA por las alteraciones inmunológicas que presenta y su aparición entre consanguíneos. Entonces si existe un antígeno HLA con un riesgo relativo mayor a uno , se logrará determinar un marcador genético, en mujeres con LES que asisten al Hospital Juárez de México.

6. MATERIAL Y METODOS.

TIPO DE ESTUDIO.

La investigación se realizó sobre un diseño: Transversal y descriptivo, porque va dirigido a determinar como es la frecuencia de ciertos antígenos HLA clase I y II en pacientes con LES, así como el Riesgo Relativo de contraer esta enfermedad si están presentes dichos antígenos.

POBLACION.

En el presente estudio se trabajó con muestras de sangre desfibrinada de 30 mujeres positivas a LES que acuden al servicio de Reumatología del Hospital Juárez de México, a las cuales se les realizó diagnóstico clínico de LES. Así como un grupo control de 50 personas sanas donadoras de riñón no relacionadas con LES, sometidas a escrutinio básico de laboratorio y consulta integral medica. A la población antes descrita se le realizó la tipificación de su HLA clase I y II mediante la técnica de microlinfotoxicidad en placa.

CRITERIOS DE INCLUSION.

- * Mujeres con diagnóstico clínico de LES, sin importar edad.
- * Para el grupo control personas sanas mestizas en edad reproductiva, no consanguíneas, donadoras de órgano (riñón).

CRITERIOS DE EXCLUSION.

- * Mujeres con otra patología semejante a LES determinada clínicamente.

MATERIAL, EQUIPO Y REACTIVOS.

MATERIAL

Tubos de ensaye.
Tubos con tapón de rosca.
Pipetas Pasteur.
Vasos de precipitado.
Pipetas graduadas.
Bulbos de hule.
Popotes de plástico.
Fibra de nylon.
Jeringas desechables.
Perlas de vidrio
Espátula
Cajas petri
Microjeringa
Microjeringa
Cámara de Newbauer
Cubreobjetos
Placas Terasaki

ESPECIFICACIONES.

13X100 KIMAX
16X150 PIREX

250 y 1000ml PIREX
1 y 5ml

15cm

Plastipak 10ml
2mm KIMAX

PIREX
Hamilton múltiple 250/5uL
Hamilton simple 50/1uL
Propper Lumicyte
50X75mm
60 micropozos GREINER

EQUIPO.

Balanza granataria
Centrífuga refrigerada
Congelador vertical
Incubadora
Microscópio simple
Microscópio de contraste de fase
Invertido
Refrigerador
Rotator Clínico

OHAUS
Sorvall Mod. RT6000B
Revco Mod. ULT2186A-O-E.
Napco Mod. 302
OLIMPUS CH-2

ZEISS, Axiovar 10
Heavy Duty
Fisher Scientific.

REACTIVOS.

Suero anti-HLA:
Clase I (15 anti-A y 22 anti B)
Clase II (14 anti-DR y 8 anti-DQ)
Complemento de conejo
Medio de cultivo celular
Suero fetal de ternera
Eosina al 5%
Formaldehído al 30% pH 7
Aceite mineral
Ficoll-Hypaque
Azul de tripán

Biotest Diagnostics

Biotest Diagnostics
RPMI-1640 Sigma
Hyclone
Sigma
MERCK
Sigma
Lymphoprep Hycomed.
Sigma

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

METODO.

PREPARACION DE PLACAS TERASAKI.

Colocar sobre las placas Terasaki de 60 micropozos, una gota de aceite mineral en cada pozo con una pipeta Pasteur, para evitar la evaporación del antisuero y facilitar la mezcla de éste con la suspensión celular. Adicionando 1uL de suero anti-HLA de diferentes especificidades (15 sueros anti-A y 22 anti-B), un control positivo y un control negativo como se muestra en tabla No. 1. Para los determinantes clase II, se realiza de igual forma, adicionando los sueros correspondientes a DR y DQ (14 anti-DR y 8 anti-DQ), como se muestra en la tabla No. 2 . Congelar las placas a -65° C y descongelar 15 min. antes de utilizar.

OBTENCION DE LINFOCITOS TOTALES.

Se obtuvieron 10mL de sangre periférica por venopunción, colocando la sangre en un tubo de ensaye con tapón que contiene perlas de vidrio para desfibrinar por rotación perpendicular durante 5-10 minutos.

Diluir con un volúmen igual de medio RPMI 1640 preincubado a 37° C, depositando en cuatro tubos de ensaye 3mL de solución Ficoll-Hypaque. Adicionar cuidadosamente la sangre diluida por las paredes del tubo, centrifugar a 3000rpm durante 20 min. y aspirar los linfocitos que forman un anillo blanco sobre la interfase con una pipeta Pasteur y colocar en 2 tubos de ensaye, lavando dos veces con RPMI 1640 y centrifugando a 900 y 1500 rpm durante 10 minutos respectivamente. Resuspender los linfocitos y ajustar a 1×10^6 células por mL con medio RPMI si la muestra se encuentra muy concentrada, con ayuda de una cámara de Neubauer, ajustar el número de células, cargar la cámara con una mezcla de la suspensión de linfocitos y colorante azul de tripán en relación 1:1.

Contar 5 cuadros de la cuadrícula central para globulos rojos, el cual corresponde a un volúmen de 0.02uL.

El número de células por mL se calculó de al manera siguiente:

$$\text{No de celulas / ml} = \frac{(n) \times 1000 \mu\text{LX dilución}}{0.02 \mu\text{L} \times 1 \text{ mL}}$$

n = número de células contadas

Dilución = 2

Para el ajuste se realiza una regla de 3.

SEPARACION DE LINFOCITOS T Y B POR COLUMNA DE NYLON.

Colocar 100g de lana de nylon en una caja Petri y cepillar para evitar aglomeraciones, empacando uniformemente un popote sellado a la flama en ángulo de 45° con lana de nylon, previamente humedecida con RPMI 1640, haciendo varias horadaciones en el extremo cerrado del popote para permitir la salida del líquido, enseguida lavar con Suero Fetal de Ternera (SFT) al 20% en RPMI 1640 e incubar el popote con el medio a 37°C durante 30min., sacar la columna y lavar con RPMI 1640: Agregar los linfocitos totales aislados con Ficoll-Hypaque al popote e incubar a 37°C durante 30 min.

Sacar la columna y lavar con RPMI 1640 a 37°C, para separar los linfocitos T, mientras los linfocitos B absorbidos en la lana de Nylon son recuperados, mediante dos lavados con SFT al 20% frío. Centrifugar a 900 y 1500 rpm respectivamente en cada lavado.

TECNICA DE MICROLINFOCITOTOXICIDAD.

Sacar las placas AB y DR del congelador para que tomen la temperatura ambiente adicionando 1uL de suspensión de linfocitos totales a las placas AB ajustados a una concentración de 1×10^6 , incubando durante 30 min. a temperatura ambiente. Añadir 1uL de complemento de conejo e incubar 1 hora. Para las placas DR adicionar 2uL de linfocitos B ajustados a 1×10^5 células, más 1uL de complemento e incubar con agitación durante 1 hora en un rotator clínico.

Colocar 5uL de eosina al 5% y 5uL de formaldehído al 30%, dejando en refrigeración toda la noche para permitir el asentamiento de los linfocitos. Cubrir cuidadosamente con un cubreobjetos de 50x75mm, evitando la formación de burbujas y observar en el microscopio invertido de contraste de fases. Las células lisadas toman el colorante y aparecen de color oscuro, mientras los linfocitos viables son brillantes y refractarios.

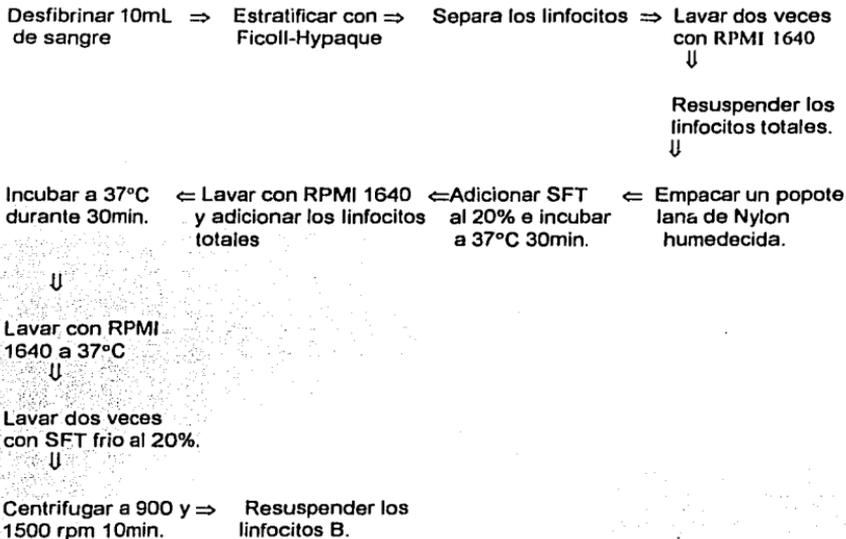
CRITERIO DE INTERPRETACION.

Una prueba positiva es designada por el porcentaje de linfocitos muertos. Si el control negativo contiene células muertas, el porcentaje de dichas células deberá de ajustarse a los demás pozos leídos.

Escala	% de Citotoxicidad	Interpretación
1	0-10%	Negativa
2	11-20%	Posible negativa
3	21-50%	Positiva poco convincente
4	51-80%	Positiva
5	81-100%	Muy positiva

7. DIAGRAMA DE FLUJO.

SEPARACION DE LINFOCITOS TOTALES Y LINFOCITOS B.



PRUEBA DE MICROLINFOCITOTOXICIDAD EN PLACA:

Clase I:

Adicionar 1 uL de
linfocitos totales
(1×10^6 células)



Incubar 30min a \Rightarrow
temperatura
ambiente

Adicionar 1uL \Rightarrow
de complemento
e incubar 60
minutos a
temperatura
ambiente

Adicionar 5uL \Leftarrow Incubar una hora con
de eosina al 5% agitación.



Colocar 5uL de
formaldehído al 30% y colocar en
refrigeración toda la noche.



Leer en el microscopio invertido
de contraste de fases.

Clase II:

Adicionar 2uL de linfocitos
B (1×10^6 células) +
1uL de complemento



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TABLA No. 1. Distribución los 37 sueros anti-HLA clase I en las placas Terasaki.

CP	CN	A1	A1	A2	A2
A23	A9	A9	A2,28	A3	A3
A24	A25	A25,26,34, 66	A25,26,34, 66	A11	A29
A32	A2,28	A1	Bw35,53 Cw4	Bw35,53	B5,51,52
Bw5,35,53	B7	B7	B7,42	B7,27	B12,44,45
Bw12,49, 41	B13	B14	Bw15,37, 62,63	B16,38,34	B16,38,34
B27	B21,49,50	B8	Bw4	B40	Bw42
Bw6	B37	B7,27	B73	Bw53,35	B21,49,50
B40	B5,51,52	B17,57,58	B7 Bw42	B27	A2,28
A10,21,26, 34	B18	B18	A29	B32	Bw49,51, 52

CP= Control Positivo

CN= Control Negativo

El Control positivo es un suero anti-humano obtenido de conejos, fuertemente citotóxico para los linfocitos humanos. El control negativo es suero de hombres sanos, grupo sanguíneo AB y que no presenta reactividad citotóxica.

Tabla No. 2. Distribución de los 22 sueros anti-HLA clase II, en las placas Terasaki.

	CP	CN	DR1	DR1	DR3	DR3
	DR4	DR4	DR7	DR7	DR8	DR8
	DR9	DR9	DR6	DR6	DR11	DR11,12
	DR12	DR12	DR14	DR14	DR13,14	DR13,14
	DR15	DR15,16	DR17	DR17,18	DRw52	DR52
	DQ1	DQ1	DQ2	DQ2	DQ4	DQ4
	DQ5	DQ6,5	DQ6,5	DQ6	DQ7	DQ7,8,9
	DQ7,6	DQ7,6	DQ8	DQ8	DQ9	DQ9

CP= Control positivo

CN= Control negativo

8. ANALISIS ESTADISTICO DE DATOS.

En la frecuencia de una enfermedad con los alelos del MHC, es necesario conocer si existe un aumento significativo de determinado alelo en individuos que presentan alguna enfermedad con respecto a la frecuencia encontrada en la población normal. Para este análisis se empleó el método propuesto por Woolf en 1955 y modificado por Haldane.

En donde los datos con respecto a un antígeno particular, se cuantifican mediante una tabla de contingencia 2 X 2:

	Numero de individuos		
	POSITIVOS PARA EL ANTIGENO	NEGATIVOS PARA EL ANTIGENO	TOTAL
PACIENTES	A	B	A+B
CONTROLES	C	D	C+D
TOTAL	A+C	B+D	N

Con los datos de esta tabla se realizaron los calculos siguientes:

$$\text{FRECUENCIA DEL ANTIGENO EN LOS PACIENTES: } P = \frac{A}{A + B}$$

$$\text{RIESGO RELATIVO: } R.R = \frac{A \times D}{B \times C}$$

La incidencia mide la razón del desarrollo de la enfermedad. Por tanto es una medida del riesgo de la enfermedad, útil para estudiar las posibles razones para su desarrollo, una medida usada con este propósito es el riesgo relativo, que indica cuantas veces es más frecuente la enfermedad en individuos positivos para un antígeno, en comparación con individuos negativos para el mismo antígeno.

9. RESULTADOS.

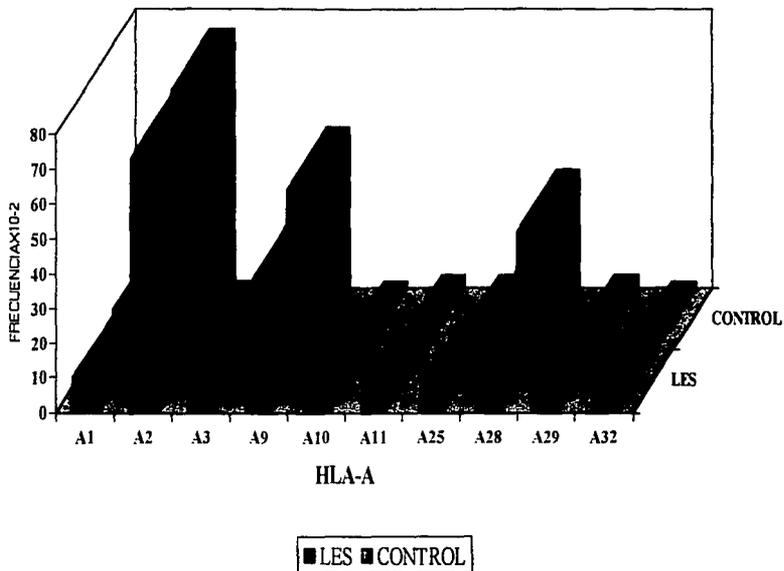
La frecuencia obtenida para los antígenos clase I y II, en la población estudiada se muestran en la tabla No. 3 y 4. En la gráfica No. 1 y 4, se observan los antígeno HLA más frecuentes.

TABLA No. 3 Frecuencia de antígenos HLA clase I en la población estudiada.

HLA	FRECUENCIA EN MUJERES CON LES	FRECUENCIA EN CONTROLES	HLA	FRECUENCIA EN MUJERES CON LES	FRECUENCIA EN CONTROLES
A1	0.10	0.12	B5	0.10	0.24
A2	0.73	0.74	Bw6	0.06	0.04
A3	0.20	0.08	B7	0.26	0.20
A9	0.36	0.46	B8	0.16*	0.04
A10	0.13	0.02	B12	0.20	0.12
A11	0.03	0.04	B13	0.00	0.00
A25	0.03	0.04	B14	0.00	0.06
A28	0.23	0.34	B15	0.06	0.04
A29	0.13	0.04	B16	0.20	0.28
A32	0.03	0.02	B17	0.06	0.00
			B18	0.00	0.14
			B21	0.16	0.04
			B27	0.00	0.02
			B35	0.36	0.50
			B37	0.03	0.00
			B40	0.30	0.24

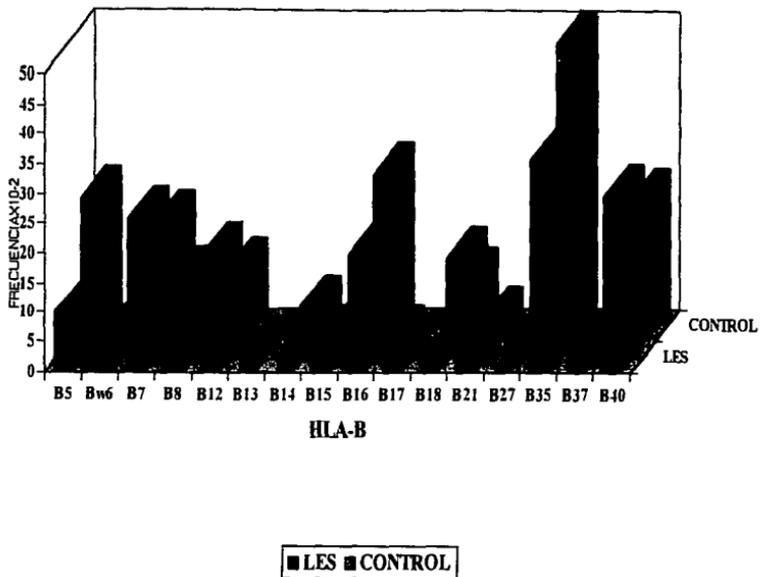
* Antígenos HLA con una frecuencia mayor respecto al grupo control.

GRAFICA N° 1 FRECUENCIA DE HLA CLASE I EN LA POBLACION ESTUDIADA



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

GRAFICA N° 2 FRECUENCIA DE HLA CLASE I EN LA POBLACION ESTUDIADA



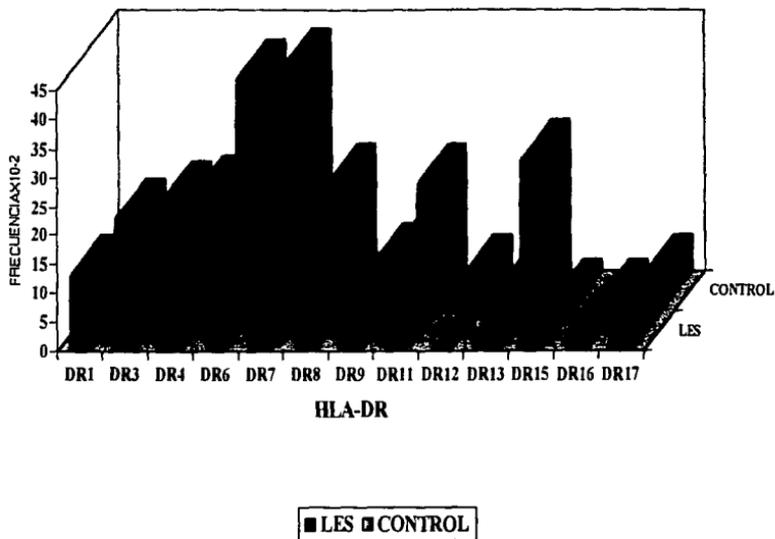
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TABLA No 4 Frecuencia de antígenos HLA clase II en la población estudiada.

HLA	FRECUENCIA EN MUJERES CON LES	FRECUENCIA EN CONTROLES	HLA	FRECUENCIA EN MUJERES CON LES	FRECUENCIA EN CONTROLES
DR1	0.13	0.08	DQ1	0.20	0.46
DR3	0.23*	0.08	DQ2	0.20	0.16
DR4	0.26	0.20	DQ3	0.33*	0.02
DR6	0.23	0.40	DQ4	0.13	0.10
DR7	0.16	0.42	DQ5	0.20*	0.08
DR8	0.13	0.22	DQ6	0.20	0.14
DR9	0.10	0.08	DQ7	0.23	0.18
DR11	0.16	0.22	DQ8	0.20	0.32
DR12	0.00	0.06	DQ9	0.06	0.22
DR13	0.03	0.06			
DR15	0.33*	0.02			
DR16	0.03	0.02			
DR17	0.06	0.06			

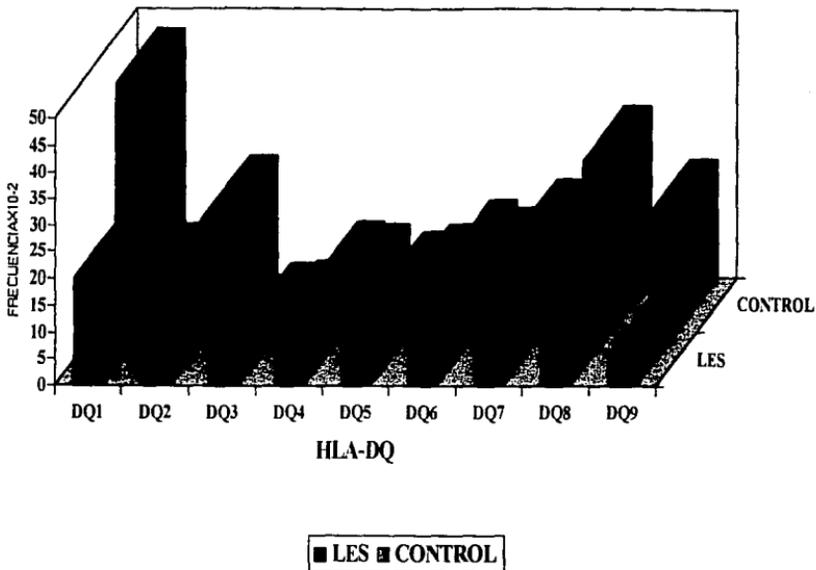
* Antígenos HLA con una frecuencia mayor respecto al grupo control.

GRAFICA N° 3 FRECUENCIA DE HLA CLASE II EN LA POBLACION ESTUDIADA



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

GRAFICA N° 4 FRECUENCIA DE HLA CLASE II EN LA POBLACION ESTUDIADA



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RIESGO RELATIVO DE ANTIGENOS HLA ASOCIADOS CON LES EN LA POBLACION ESTUDIADA.

TABLA No. 5 HLA clase I y Riesgo Relativo hacia LES en la población estudiada.

HLA	EPA	ECA	TOTAL DE PACIENTES	CPA	CCA	TOTAL DE CONTROLES	R.R
A1	3	27	30	6	44	50	0.81
A2	22	8	30	37	13	50	0.96
A3	6	24	30	4	46	50	2.87
A9	11	19	30	23	27	50	0.67
A10	4	26	30	1	49	50	7.53
A11	1	29	30	2	48	50	0.82
A25	1	29	30	2	48	50	0.82
A28	7	23	30	17	33	50	0.59
A29	4	26	30	2	48	50	3.69
A32	1	29	30	1	49	50	1.51
B5	3	27	30	12	38	50	0.35
Bw6	2	28	30	2	48	50	1.71
B7	8	22	30	10	40	50	1.45
B8	5	25	30	2	48	50	4.80
B12	6	24	30	6	44	50	1.83
B13	0	30	30	0	50	50	0.00
B14	0	30	30	3	47	50	0.00
B15	2	28	30	2	48	50	1.71
B16	6	24	30	14	36	50	0.64
B17	2	28	30	0	50	50	0.00
B18	0	30	30	7	43	50	0.00
B21	5	25	30	2	48	50	4.80
B27	0	30	30	1	49	50	0.00
B35	11	19	30	25	25	50	0.57
B40	9	21	30	12	38	50	1.35

EPA = Enfermos que presentan el antígeno.

ECA = Enfermos que carecen del antígeno.

CPA = Controles que presentan el antígeno.

CCA = Controles que carecen del antígeno.

R.R = Riesgo Relativo.

TABLA No 6 HLA clase II y Riesgo Relativo hacia LES en la población estudiada

HLA	EPA	ECA	TOTAL DE ENFERMOS	CPA	CCA	TOTAL DE CONTROLES	R.R
DR1	4	26	30	4	46	50	1.00
DR3	7	23	30	4	46	50	3.50
DR4	8	22	30	10	40	50	1.45
DR6	7	23	30	20	30	50	0.45
DR7	5	25	30	21	29	50	0.27
DR8	4	26	30	11	39	50	0.40
DR9	3	27	30	4	46	50	1.27
DR11	5	25	30	11	39	50	0.70
DR12	0	30	30	3	47	50	0.00
DR13	1	29	30	3	47	50	0.55
DR15	10	20	30	1	49	50	24.5
DR16	1	29	30	1	49	50	1.68
DR17	2	28	30	3	47	50	1.11
DQ1	6	24	30	23	27	50	0.29
DQ2	6	24	30	8	42	50	1.31
DQ3	10	20	30	1	49	50	24.5
DQ4	4	26	30	5	45	50	1.38
DQ5	6	24	30	4	46	50	2.87
DQ6	6	24	30	7	43	50	1.53
DQ7	7	23	30	9	41	50	1.38
DQ8	6	24	30	16	34	50	0.53
DQ9	2	28	30	11	39	50	0.25

EPA = Enfermos que presentan el antígeno.

ECA = Enfermos que carecen del antígeno.

CPA = Controles que presentan el antígeno.

CCA = Controles que carecen del antígeno.

R.R = Riesgo Relativo.

10. DISCUSION DE RESULTADOS

Estos resultados se muestran en las tablas No. 3 y 4 y en las gráficas No. 1 a 4 donde los antígenos HLA más frecuentes en la población estudiada (pacientes y grupo control) fueron:

HLA Clase I : A2, A9, A28, B7, B16, B35 y B40.

HLA Clase II. DR4, DR6, DR7, DR8, DR11, DQ1, DQ6, DQ7 y DQ8.

Estos alelos concuerdan con lo reportado en la bibliografía en estudios realizados en poblaciones mestizas mexicanas (50,60). Siendo los alelos A2, B35, DR7 y DQ1 los más comunes, ya que se encuentran prácticamente en todas las poblaciones. El antígeno A2 es el que se encuentra con mayor frecuencia, por considerarse un antígeno universal presente en la mayoría de la población mundial. En la tabla No. 3 se muestra un aumento de A28 y A9 que son variantes estructurales de A2, las cuales dan reactividad serológica cruzada con este antígeno, que explica el aumento de estos dos antígenos.

Los alelos HLA-B más comunes en la población estudiada son HLA-B35 y B40 de origen autóctono (Indígena).

En lo que compete a la región clase II, el aumento de los alelos DR6 y DR7 sustenta el hecho del mestizaje con grupos étnicos de origen negro y oriental. Siendo muy notorio el aumento del alelo DR4 uno de los alelos más comunes en la población mestiza estudiada (controles y pacientes), generalmente de origen autóctono; este origen se refleja por la asociación que tiene con los alelos del locus HLA-B: B35 y B40, los más comunes en la población mestiza mexicana.

Al comparar las frecuencias de alelos presentes en pacientes con el grupo control, se encontraron aumentos significativos de los antígenos B8, DR3, DR15, DQ3 y DQ5. La presencia de un aumento del antígeno B8 asociado con LES en la población caucásica, refleja el mestizaje con este grupo étnico, particularmente de origen español.

El alelo DR3 presente en todas las poblaciones (oriental, caucásica y negra), mostró un aumento de este alelo igual que en otras poblaciones, representando un riesgo elevado de contraer LES. La presencia en México del alelo DR3 es de origen español.

El alelo HLA-DR15 (44) frecuente en pacientes orientales con LES, muestra el mestizaje con este grupo étnico, claramente de origen coreano.

Mientras la elevada frecuencia de los alelos DQ3 y DQ5 es debido a la presencia de grupos indígenas dentro de nuestro mestizaje.

El Riesgo Relativo (R.R) es una medida de incidencia que indica cuantas veces es más frecuente la enfermedad en individuos positivos para un antígeno, en comparación con individuos que carecen del antígeno; es decir indica la posibilidad de un individuo que presenta el antígeno HLA, asociado con la enfermedad de desarrollar esta, en comparación con un individuo que carece de tal antígeno, aunque éste sea heredado de un padre y no adquirido de alguna clase de exposición. El reporte de resultados obtenidos se muestran en la tabla No. 5 y 6, en donde se puede observar que los antígenos HLA con mayor R.R son:

HLA clase I : A10 R.R=7.53, B8 R.R= 4.8, B21=4.8

HLA clase II : DR3 R.R= 3.5, DR15 R.R= 24.5, DQ3 R.R= 24.5, DQ5= 2.87.

Muchos otros antígenos clase I muestran R.R mayores a 1, que no podemos relacionar con LES debido a que el número de pacientes que lo presentaron es reducido, al igual que en el grupo control lo que sugiere que los resultados obtenidos no son estadísticamente significativos. Por consiguiente no los podemos considerar como marcadores de riesgo en el desarrollo de LES.

Dentro de esto se observo que la asociaciones más consistentes residen en alelos de los genes de clase II (HLA-DR y DQ), en particular con el DR3. Sin embargo, la presencia de un alto R.R en antígenos DR15 y DQ3, probablemente deriva del mestizaje con individuos de diversos grupos étnicos, lo cual sienta las bases de estudios ulteriores que revelen el mecanismo molecular en que dicho mestizaje desarrolla el LES, principalmente en la región DQ involucrada en la formación de moléculas híbridas por apareamiento trans, involucradas en las relaciones de HLA y enfermedad.

Por lo tanto la tipificación de antígenos HLA clase II puede ser empleado en personas con familiares de primer grado afectados con LES, en donde si están presentes alguno de estos antígenos, se realicen medidas preventivas a evitar factores de riesgo desencadenantes de la enfermedad, así como prueba de apoyo que pueda ser solicitada por el personal médico en el diagnóstico de LES.

11. CONCLUSIONES.

-Muchos antígenos generalmente clase I mostraron R.R mayores a 1 que no podemos relacionar con LES debido a que el número de pacientes que lo presentaron es reducido, al igual que en el grupo control, lo que sugiere que los resultados no son estadísticamente significativos.

No obstante, se encontraron asociaciones importantes con los antígenos HLA clase II (DR y DQ), en particular con el HLA DR-3, DR-15 y DQ3, lo que permite pensar que el gen de la cadena DRB1 aportado por un grupo étnico, se complementa con los alelos del gen de las cadenas DQA y DQB aportado por otro grupo étnico diferente, constituyendo de esta manera moléculas híbridas que hacen particularmente susceptible al desarrollo del LES, describiendo el papel de los genes del MHC en la susceptibilidad genética al desarrollo de LES en mexicanos y confirmando datos encontrados en otros estudios con pacientes mexicanos.

El elevado Riesgo Relativo en la región DR y DQ deriva del mestizaje con individuos de diverso origen étnico, da las bases para estudios posteriores que revelen el mecanismo molecular de la forma en que dicho mestizaje desarrolla el LES, utilizando técnicas de Biología Molecular como la amplificación de genes DR y DQ por Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP) e identificación de los alelos de cada uno de los genes mediante sondas específicas con el fin de detectar subtipos moleculares de dichos alelos.

-La incidencia de LES en el Hospital Juárez de México fué de 30 casos por cada 75,000 personas, debido a que sólo se captarán los pacientes con LES grave que requieren monitoreo constante por parte del área de Reumatología del hospital.

-Este trabajo muestra que los mexicanos con LES son muy heterogéneos genéticamente, debido a la gran variedad de alelos HLA presentes de otros grupos étnicos (caucasico, oriental y negro).

-Se encontro evidencia para establecer que existen antígenos HLA clase II relacionados con LES, los cuales pueden servir como prueba de apoyo para un temprano diagnóstico del paciente con LES, siempre sustentado con otros hallazgos clínicos y de laboratorio.

12. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

- 1.- Stites P.D., Terr I.A., Cursoli P. Inmunología Humana y Básica. 2ª ed. México: El manual Moderno, 1994. 47-91.
- 2.- Male D. Champion B., Cooke A. Advanced in Immunology. New York: Grover Medical publishing, 1987. 170-190.
- 3.- Abbas K.A., Lichtman H.A., Pober S.J. Inmunología Celular y Molecular. 2ª ed. España: Interamericana, 1995: 107-170.
- 4.- Dick M. H. Histocompatibility Techniques. New York: Elsevier North-Holland, 1979. 1-30.
- 5.- Tizard I. R. Immunology an Introduction. 3ª ed. London: Saunders College Publishing, 1992. 50-80.
- 6.- Bodmer J. G., Marsh S. G., Albert E. D. et col., Nomenclature for factors of the HLA system, 1991, Tissue Antigens, 1992; 39; 161-173.
- 7.- Trowsdale J., Jiannis R., Campbell R.D., Map of the Human MHC, Immunol. Today, 1993; 14:7; 349-352.
- 8.- Furosho Y.J., Granados J., El Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) y las enfermedades autoinmunes, Rev. Colomb. Reum., 1997; 4:1; 19-25.
- 9.- Beatty P.G., Mickelson E.M., Petersdorf E.W., Chou Y., Geraghty D. E., Histocompatibility 1991, Transfusion, 1991; 31:9; 18-27.
- 10.- Bellanti A.J. Inmunología. 3ª ed. México: Interamericana, 1990. 59-90.
- 11.- Campbell R.D., The Molecular Genetics and Polimorphism of C2 and Factor B, Br. Med. Bull., 1987; 43:1; 37-49.
- 12.- Carroll C.M., Alper A.Ch., Polimorphism and Molecular Genetics of Human C4, Br. Med. Bull, 1987; 43:1; 50-65.
- 13.- Braum M., Satz M.L., Tito E.. Inmunología e Inmunogenética. 2ª ed. España: Margni, 1989. 148-153.

- 14.- Eng M.T., Cohen A.S., Fries F.J. et col., The 1982 Revised Criteria for the Clasification of Sistemic Lupus Erythematosus, *Arthritis Rheum.*, 1982; 25:11; 1271-1277.
- 15.- Woodrow C.J., Immunogenetics of Systemic Lupus Erythematosus, *J. Rheumatol.* 1988; 15:2:197-199.
- 16.- Morrow J., Isenberg D.. Autoimmune Rheumatic Disease. Chicago: Black Well Scientific, 1987. 48-120.
- 17.- Kemp E.M., Atkinson P. J., Skanes M.V., Levine P., Chaplin D.D., Deletion of C4A Genes in Patients with Sistemic Lupus Erythematosus, *Arthritis and Rheum.*, 1987; 30:9; 1015-1022.
- 18.- Schur H. P. , Meyer I., Garavay M., Carpenter C.B., Associations between Systemic Lupus Erythematosus and the Major Histocompatibility Complex, Clinical and Immunological Considerations, *Immunol. Immunopathol.*, 1982; 24; 263-275.
- 19.- Segovia A. D., Cabral R. A., Antiphospholipid Antibodies, *J. Rheumtol.*, 1994; 21:6; 982-989
- 20.- Asherson R.A., Doherty D.G., Vergani D., Khamashta M. , Major Histocompatibility Complex Associations with Primary Antiphospholipid Syndrome, *Arthritis and Rheum.*, 1992; 35:1; 124-125.
- 21.- Braun L., Schneider M. P., Carolyn M.G., Bertrams J., Rittner C., Null Alleles of Human Complement C4, *J. Exp. Med.*, 1990; 171;129-140.
- 22.- Reguifiro J.R, Villena A.A., Human MHC Class III (BF,C2,C4) Genes and GLO: Their Association with other HLA Antigens and Extended Haplotypes in the Spanish Population, *Tissue Antigens*, 1987; 31; 14-25.
- 23.- Vargas A.G., Andrade F., Weckmann A.L. et col., Frecuency of Complotypes in Mexican Mestizo Population, *Inmunologia*, 1996; 15; 129-134.
- 24.- Berliner S., Weinberger A., Zamir R., Salomon F., Jushua H., Pinkhas J., Familial Systemic Lupus Erythematosus and C4 Deficiency, *Scand. J. Rheumatol.*, 1981; 10; 280-282.
- 25.- Warrington J. R., B Cell Diferentation Factor Production in Systemic Lupus Erythematosus, *J. Rheumatol.*, 1988; 15; 54-58.
- 26.- Scherak O., Smolem J.S., Meyr W.R., HLA-DRw3 and Systemic Lupus Erythematosus, *Arthritis and Rheum.*, 1980; 8; 954-957.

27.- Davies E.J., Steers G., Ollier E.R., Grennan D.M., Cooper R.G., Hay E.M., Relative Contributions of HLA-DQA and Complement C4A Loci in Determining Susceptibility to Systemic Lupus Erythematosus, B. J. Rheumatol., 1995; 34; 221-225.

28.- Winchester R.J., Roldan N. A., Some Genetic Aspects of Systemic Lupus Erythematosus, Arthritis and Rheum., 1982; 25:7; 833-837.

29.- Belin C.D., Bordwell J. B., Einarson E.M. et col., Familial Discoid Lupus Erythematosus Associated with Heterozygote C2 Deficiency, Arthritis and Rheum., 1980; 23:8; 898-903.

30.- Deapen D., Escalante A., Weinrib L. et col., A Revised Estimated of Twin Concordance in Systemic Lupus Erythematosus, Arthritis and Rheum., 1992; 35:3; 311-318.

31.- Bell A.D., Maddison J.P., Serologic Subsets in Systemic Lupus Erythematosus, Arthritis and Rheum., 1980; 23:11; 1268-1273.

32.- Reichlin M., Harley B. J., and Michael D. L., Serologic Studies of Monozygotic Twins with Systemic Lupus Erythematosus, Arthritis and Rheum., 1992; 35:4; 457-464.

33.- Franek Z., Timmerman A.L., Alper A.Ch. et col., Major Histocompatibility Complex Genes an Susceptibility to Systemic Lupus Erythematosus, Arthritis and Rheum., 1990; 33:10; 1542-1553.

34.- Vinay K., Ramzisi C., Stanley L.R. Patología Humana. 5ª ed. México: Interamericana, 1995. 142-149.

35.- Parakrama Ch., Clive R. T. Patología General. 2ª ed. México: El Manual Moderno, 1994. 1065-1068.

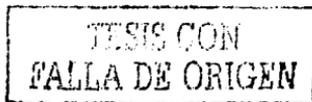
36.- Brastoff J., Gray A., Male D., Roitt I. Casos Clínicos en Inmunología. 3ª ed. Madrid: Mosby, 1996. 71-74.

37.- Stewart S. Inmunología, Inmunopatología e Inmunidad. 2ª ed. México: Harla, 1990. 192-196.

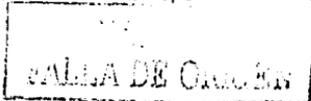
38.- Turgeon M.L. Inmunology an Serology in Laboratory Medicine. Canada: Mosby , 1990. 297-306.

39.- Montalvo L.C. Reumatología Clínica. México: 2ª ed. Limusa, 1990. 353-361.

40.- Margini A. R. Inmunología e Inmunoquímica. 4ª ed. Argentina: Médica Panamericana, 1989. 362-370.



- 41.- Schurt P.H., Marcus B.D., Awdeh Z., Yunis E. J., Alper C.. The effect of Ethnicity on Major Histocompatibility Complex Complement Allotypes and Extended Haplotypes in Patients with Systemic Lupus Erythematosus, Arthritis and Rheum., 1990; 33:7; 985-992.
- 42.- Hashimoto H., Tsuda H., Matsumoto T. et col., HLA Antigens Associated with Systemic Lupus Erythematosus in Japan, J. Rheumatol., 1985; 12:5; 919-923.
- 43.- Malcolm F.S., Tait D.B. Practical Methods in Clinical Immunology. London: Churchill Livingstone, 1984: vol. 7.
- 44.- Doherty G.D., Ireland T., Demaine G.A, et col., Major Histocompatibility Complex Genes and Susceptibility to Systemic Lupus Erythematosus in Southern Chinese, Arthritis and Rheum., 1992; 35:6; 641-646.
- 45.- Awdeh Z.L., Williamson R.A., Askunas A.B., Isoelectric Focusing in Polyacrilamide Gel and its Application to Immunoglobulins, Nature, 1968; 219; 66-67.
- 46.- Roos H.M., Mollenhaver E., Demant P., Rittner C., Molecular Basis for the Two Locus Model of Human Complement Component C4, Nature, 1982; 26; 854-856.
- 47.- Barbara G., Rittner C., Schneider P., Genetics Basis of Human Complement C4A Deficiency, J. Clin. Invest., 1993; 91; 1681-1686.
- 48.- Awdeh Z. L., Alper A. C., Genetics of Complement Components in Man, Immunobiology, 1980; 158; 35-41.
- 49.- O'neill J.G., Young S., Dupont B., Twon HLA-Likend Loci Controlling the Fourth Component of Human Complement, Proc. Natl. Acad. Sci., 1978; 75:10; 5165-5169.
- 50.- Tokunaga K., Araki C., Juji T., Omoto K., Genetic Polymorphism of the Complement C2 in Japaneses, Hum. Genet., 1981; 58; 213-216.
- 51.- OMSS. Serie de Informes Técnicos de Enfermedades Reumaticas. España: OMSS, 1992. 15-18.
- 52.- Tan E.M., Consideration of Autoantibodies as Inmune Imprints and Reporters of the Original Antigenic Stimulus, En Proceedings of the Second International Conference on LES, Singapore Profesional Postgraduate Services International 1989. 3-6.
- 53.- Reveille J., MacLeand M., Whittington K., Specific Amino Acid Residues in the Second Hipervariable Region of HLA-DQA1 and DQB1 Chain Genes Promote the Ro(SS-A)/ La(SS-B) Autoantibody Responses, J. Immunol., 1991; 11:1; 3871-3876.
- 54.- Hamilton R., Harley J., Bias W. et col, Two Ro (SS-A) Autoantibody Responses in Systemic Lupus Erythematosus. Correlation of HLA-DR/ DQ Specificites With



Quantitative Expression of Ro(SS-A) Autoantibody, Arthritis and Rheum., 1988; 31:4; 496-505.

55.- Fujisaku A., Barton M., Neas B., Reichlin M., Harley J., HLA-DQ Gene Complementation and Other Histocompatibility Relationships in Man With the Anti Ro/SSA Autoantibody Responses of Systemic Lupus Erythematosus, J. Clin. Invest., 1990; 86; 606-611.

56.- Olsen M., Arnett F., Reveille J., Contrasting Molecular Patterns of MHC Class II Alleles Associated with the Anti-Sm y Anti-RNP Precipitin Autoantiboides in Systemic Lupus Erythematosus, Arthritis and Rheum., 1993; 36:11; 94-104.

57.- Sullivan K., Petri M., Schmeckpeper B., McLean R., Winkelstein J., Prevalence of a Mutation Causing C2 Deficiency in Systemic Lupus Erythematosus, J. Rheumatolo., 1993; 21:6; 1128-1133.

58.- Johnson Ch., Densen P., Wetsel R., Cole S., Goeke N., Colten H., Molecular Heterogeneity of C2 Deficiency, N. Engl. J. Med., 1992; 326:13; 871-874.

59.- Arellano J. I., et col., HLA Antigens to amaebic Abscess of the liver in Mexican mestizos. Parasite Immunol. 1987; 9 : 757-760.

60.- TD. Lee, A. Lee, W Sii, HLA A, B, DR, Antigen In Mexican mestizos et Black North Americans. Tissue Antigens, 1991; 37: 79-83.

61.- Granados J. V., y col. The role of HLA-DR alleles and complotypes through the ethnic barrier in systemic lupus erythematosus in Mexicans. Lupus 1996: en prensa.