

11262 32



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

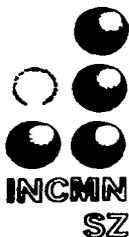
**FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MEDICAS Y NUTRICION
"SALVADOR ZUBIRAN"**

**MARCADORES INMUNOGENETICOS ASOCIADOS A LA
SUSCEPTIBILIDAD DE DESARROLLAR COLITIS ULCEROSA
CRONICA INESPECIFICA (CUCI) EN PACIENTES
MEXICANOS.**

T E S I S

**PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS MEDICAS
(I N M U N O L O G I A)
P R E S E N T A :
DR. JESUS KAZUO YAMAMOTO FURUSHO**

**DIRECTOR DE TESIS: DR. JULIO GRANADOS ARRIOLA
COTUTOR: DR. LUIS F. USCANGA DOMINGUEZ**



MEXICO, D. F.

2002



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.

DEDICATORIAS:

A mi adorada esposa , Ana Lilia
quien me ha brindado de manera incondicional
su amor, apoyo y comprensión en todo momento.

A mis queridos padres, agradezco su amor, orientación
y motivación para mi superación académica además de
haberme conducido a través de sus consejos al buen
camino de la vida.

A mi gran amigo y maestro: Julio Granados, por compartirme
sus conocimientos, amistad y apoyo para llegar a ser buen
investigador en el futuro.

A mis tíos: Isidro y José Luis, por compartirme sus
experiencias, consejos y apoyo para poder ser un
gran profesionista.

A mis hermanos, por contar con su amistad y apoyo en
todo tipo de circunstancias.

A mi estimado Dr. Luis Uscanga por permitirme ser mi
asesor y maestro en el aprendizaje y desarrollo de esta área
interesante de la Gastroenterología.

INDICE

Indice.....	3
Antecedentes.....	5
• CUCI	
a) Historia.	
b) Epidemiología.	
c) Etiología.	
d) Anatomía patológica.	
e) Manifestaciones clínicas.	
f) Diagnóstico.	
Complejo Principal de Histocompatibilidad.....	11
Asociación de marcadores del HLA con CUCI.....	14
Planteamiento del problema.....	18
Justificación.....	19
Objetivos.....	20
Hipótesis.....	21
Pacientes y Métodos.....	22
a) Diseño del estudio.	
b) Población.	
c) Procedimiento.	
d) Análisis estadístico.	
Tamaño de la muestra.....	26
Resultados.....	27
Discusión.....	31
Conclusiones.....	35

Bibliografía.....	36
Figura.....	45
Tablas.....	46
Variables del estudio.....	50
Definiciones operacionales.....	51
Anexo 1. Forma de recolección de datos.....	52
Anexo 2. Hoja de consentimiento informado.....	54
Anexo 3. Criterios clínicos para diversas enfermedades autoinmunes.....	55
Anexo 4. Equipo, material y técnicas.....	59
Técnicas:	
I. Extracción de DNA	
II. Amplificación por PCR	
III. Marcaje de las sondas	
IV. Hibridización	

ANTECEDENTES.

COLITIS ULCERATIVA CRONICA INESPECIFICA (CUCI).

a) Historia.

Esta enfermedad se reconoció por primera vez en 1859 como una entidad separada de la disentería bacilar por Samuel Wilks, un médico del Guy's Hospital en Londres y la llamó "colitis idiopática simple", además la diferenció de la ulceración causada por la "congestión", la intoxicación por mercurio, la inflamación diftérica y de la disentería bacilar (1).

En 1909 Hawkins describió las características clínicas y la evolución natural de la enfermedad, reconoció que el curso podría ser intermitente o crónico y que los primeros episodios de gran intensidad se asocian con mortalidad elevada (2).

b) Epidemiología.

La CUCI se presenta en todo el mundo y las áreas de mayor incidencia incluyen Inglaterra, Estados Unidos de Norte América, Europa y Australia. En individuos caucásicos la incidencia varía de 3 a 15/100,000 por año, con prevalencia de 50 a 80 por cada 100,000 individuos. Las áreas de baja incidencia incluyen Japón y América del Sur, donde la tasa de incidencia es 10 veces más baja que las observada en países europeos (3).

La enfermedad afecta adultos jóvenes entre 20 y 40 años de edad pero puede presentarse un segundo pico entre la sexta y séptima décadas de la vida, afecta por igual a ambos sexos.

Existe evidencia que el tabaquismo disminuye el riesgo para desarrollar CUCI (4,5) mientras que aumenta el riesgo a desarrollar enfermedad de Crohn (6), dicha asociación parece independiente de la influencia genética (7) y del género (8).

c) *Etiología.*

Se desconoce hasta el momento aunque han postulado varias hipótesis:

1. Defecto en la barrera mucosa: Se sabe que en pacientes con CUCI existe reducción selectiva de la mucina colónica así como alteraciones en la estructura y la unión a lectina, los cuales afectan en forma adversa la función de la barrera mucosa. Por otra parte en las células epiteliales del colon existe un defecto en el metabolismo de los ácidos grasos de cadena corta mediado por la exposición a niveles incrementados de sulfuro de hidrógeno que por lo tanto altera la permeabilidad de la mucosa colónica (9-10).
2. Defecto en la inmunoregulación: Los trastornos en la regulación de la mucosa y del sistema inmunológico propician una respuesta proinflamatoria a los componentes intraluminales generando autoinmunidad a los antígenos de la mucosa colónica también se ha observado incremento de los mediadores bioquímicos proinflamatorios tales como interleucina 1, interleucina 2, interleucina 6, factor de necrosis tumoral alfa, tromboxano A2 y leucotrieno B4 así como también un defecto en la producción de mediadores anti-inflamatorios tales como el antagonista del receptor de interleucina 1, el factor de crecimiento transformante beta, la interleucina 4 y la 10, además de prostaglandina E2 y prostaciclina I2 (11). También se ha demostrado disminución significativa del antagonista endógeno del receptor de interleucina 1 (12).

3. Infección persistente: En pacientes con CUCI se ha documentado la presencia de cepas de *Escherichia coli* que expresan moléculas de adhesión que les confiere mayor patogenicidad debido al aumento de su capacidad de adherencia y en consecuencia mayor daño a la mucosa colónica. En contraparte otros agentes microbianos involucrados en la patogenia de la enfermedad de Crohn (13) tales como *Mycobacterium paratuberculosis*, paramyxovirus y *Listeria monocytogenes* no participan en la patogenia de CUCI.
4. Componentes anormales en la luz intestinal: En pacientes con CUCI no se ha documentado que existan metabolitos y factores de virulencia bacterianos como el sulfuro de hidrógeno que interfieran con la adherencia epitelial, la producción de enzimas mucolíticas que estén involucrados en el daño inflamatorio de la mucosa colónica (14).

d) *Anatomía patológica:*

Aspectos macroscópicos: Aproximadamente el 20% de los pacientes tienen pancolitis y el 80% restante presentan afección distal, que afecta predominantemente al colon izquierdo o descendente, sigmoides y recto. Las características macroscópicas se manifiestan inicialmente por una mucosa hiperémica, edematosa y granular. A medida que la enfermedad se torna más grave la mucosa se vuelve intensamente hemorrágica y resultan visibles pequeñas úlceras puntuales, las cuales aumentan de tamaño y se extienden profundamente hacia la lámina propia. Estas úlceras a menudo son irregulares con bordes sobresalientes. Pueden existir pólipos inflamatorios (pseudopólipos) como resultado de la regeneración exuberante del epitelio.

Aspectos microscópicos: La inflamación está limitada predominantemente a la mucosa, la lámina propia se torna edematosa y los capilares están dilatados y congestionados, a menudo con extravasación de eritrocitos. Existe infiltrado inflamatorio por neutrófilos, linfocitos, células plasmáticas, macrófagos, eosinófilos y mastocitos. Con el aumento de la inflamación, las células epiteliales superficiales se tornan aplanadas y se ulceran. Las úlceras pueden ser profundas y se encuentra congestión vascular en la submucosa.

e) *Manifestaciones clínicas:*

Los principales síntomas y signos consisten en evacuaciones diarreicas, sangrado rectal, eliminación de moco y dolor abdominal. La enfermedad con actividad grave a menudo se asocia con síntomas sistémicos tales como astenia, adinamia, malestar general, anorexia, fiebre, pérdida de peso, dolor a la palpación a nivel de colon y datos de desnutrición.

Las manifestaciones extraintestinales se clasifican de acuerdo al órgano afectado:

Piel: El eritema nodoso se encuentra en el 2 al 15% de los pacientes con CUCI, se caracteriza por múltiples nódulos, dolorosos a la palpación e inflamados, localizados principalmente en la parte anterior de las piernas (15).

La pioderma gangrenosa es rara y ocurre sólo en el 1 a 2% de los casos, en general se relaciona con la actividad colónica. Las lesiones suelen ser múltiples, predominan en el tronco y las extremidades, comienzan como pústulas que se desintegran, ulceran y coalescen con lesiones circundantes (15).

Boca: En por lo menos 10% de los pacientes con la enfermedad activa se producen grupos de úlceras aftosas orales que remiten rápidamente.

Ojos: Las lesiones oculares ocurren entre 5 y 15% de los pacientes con CUCI y se caracterizan por epiescleritis y uveítis anterior (16).

Articulaciones: Es el sitio de afección extraintestinal más frecuente, ocurre entre el 10 y 35% de los pacientes con CUCI, afectan el esqueleto axial y periférico. La espondilitis anquilosante se encuentra en 2% a 8% de los casos, la asociación con el HLA-B27 es del 50 al 70% (17). La artropatía periférica se presenta en 5 a 20% de los pacientes con esta patología; existen 2 clases de afección articular: Tipo 1 o pauciarticular se caracteriza por ser de presentación aguda, autolimitada con duración menor a 10 semanas, se afectan menos de 5 articulaciones y a menudo coinciden con recaídas de actividad de la CUCI. El tipo 2 o poliarticular se manifiesta por afectar 5 o más articulaciones, sintomatología persistente de meses a años, puede ocurrir independiente del curso de la enfermedad y generalmente se asocia con uveítis (18-19).

Hígado: Las elevaciones leves de las transaminasas y la fosfatasa alcalina séricas son comunes en los episodios agudos graves de CUCI, pero las concentraciones se normalizan una vez que se logra la remisión. La manifestación más frecuente es la colangitis esclerosante primaria, una afección que se observa en 2.5% a 7.5% de los casos. Esta entidad consiste en una enfermedad inflamatoria crónica del árbol biliar que se diagnostica por medio de colangiografía endoscópica. Puede involucrar los conductos intra y extrahepáticos, lo que conduce a los aspectos radiológicos como irregularidad y estenosis de los conductos biliares (20).

f) Diagnóstico:

Este se establece mediante las características clínicas, endoscópicas e histológicas. La colonoscopia es útil para evaluar la extensión, grado de actividad y toma de biopsias para la confirmación del diagnóstico.

Los datos de laboratorio son necesarios para documentar los trastornos hematológicos y permite la evaluación de la actividad de la enfermedad. La mayoría de los pacientes presentan anemia por deficiencia en hierro secundario a pérdida crónica de sangre. Otras manifestaciones incluyen la trombocitosis, eosinofilia, monocitosis e hipoalbuminemia. Se encuentran niveles elevados de reactantes de fase aguda tales como velocidad de sedimentación globular y proteína C reactiva, las que solas o en combinación son útiles como marcadores de actividad de la enfermedad especialmente cuando la enfermedad se encuentra activa (21).

EL COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD (MHC).

La regulación del sistema inmune es factible gracias a la participación de moléculas codificadas por numerosos genes, algunos de ellos localizados dentro de un complejo genético denominado MHC (Major Histocompatibility Complex), localizado en el brazo corto del cromosoma 6 (22), como se ilustra en la figura 1.

El producto de los genes del MHC tiene como función participar en el reconocimiento antigénico por parte de los linfocitos T; este proceso se lleva a cabo por medio del reconocimiento de determinantes antigénicos en asociación con el producto de los genes del MHC.

Existen tres clases de genes MHC: (clase I, clase II y clase III), los dos primeros son codificados por el sistema HLA (Human Leukocyte Antigen) y el último codifica para componentes del complemento. Los genes clase I se localizan en un segmento de 2,000 Kb de DNA en el extremo telomérico del MHC del humano, los cuales incluyen al HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-F, HLA-G y el HLA-H. Los antígenos HLA-A, B y C son glucoproteínas de membrana que se expresan en todas las células nucleadas del organismo y además constituyen los principales antígenos de trasplante en humanos. Los HLA-E, F, G y H son antígenos de diferenciación muy importantes en el desarrollo y la maduración fetales (23).

Los genes clase II se localizan en el extremo centromérico del brazo corto del cromosoma 6, dicha región incluye a los *loci* HLA-DR, DP y DQ, cada *locus* está constituido por una cadena alfa de 33 Kd y otra beta de 28 Kd que dan lugar a la expresión de una glucoproteína dimerica cuya expresión se restringe a los macrófagos, linfocitos T activados, linfocitos B, células dendríticas, epiteliales y endoteliales. Ambas cadenas se hallan insertadas en la

membrana celular mediante un dominio transmembranal también una región intracitoplasmática. Los loci HLA- DRA1 y DRB1-codifican para los polipéptidos alfa y beta respectivamente los cuales forman una molécula madura de HLA-DR clase II. Los productos de los loci DQA1 y DQB1 forman la molécula DQ y los loci DPA1 y DPB1 codifican para la molécula DP.

Los genes clase III están ubicados en un segmento de 1100 Kb localizado entre los genes clase I y clase II dentro del MHC, conteniendo aproximadamente 70 genes. El bloque de los genes del complemento se hereda como unidad genética conocida como "complotipo o haplotipo del complemento". Cada complotipo codifica la síntesis de factores del complemento C2, C4A y C4B de la vía clásica y el factor B de la vía alterna, intercalados entre los genes C4A y C4B se localizan dos genes que codifican para la expresión de la enzima 21 hidroxilasa, la cual hidroxila el carbono 21 en la biosíntesis del cortisol (24). Además contiene otros genes como los que codifican para el factor de necrosis tumoral alfa, linfotóxina alfa y beta así como a las proteínas de choque térmico de 70 kDa (HSP-70) (25).

El HLA es el sistema genético más polimórfico del ser humano. Hasta la fecha se han identificado claramente gran número de alelos siendo 746 clase I, 542 clase II y 297 clase III (26, 27).

En relación a la nomenclatura un antígeno se identifica por la letra del *locus* seguida de un número (p. Ej., A1, B51, Cw8, DR4, etc). Un alelo se identifica por la letra del *locus* seguida de asterisco y finalmente un número (p. Ej., A*0101, B*0501, Cw*0401, DRB1*0401, etc) (28).

Los genes del HLA se heredan siguiendo la primera ley de Mendel, en forma codominante, de tal forma que cada individuo tiene 2 haplotipos, uno de ellos transmitido por la madre y el otro por el padre.

Se desconoce con precisión el mecanismo que dio lugar a este extenso polimorfismo, pero se han propuesto dos hipótesis para explicarlo. La primera es la "deriva aleatoria", la cual explica que el polimorfismo se debe a las variaciones al azar de una estructura genética básica y que dicha variación tiene una cierta frecuencia dentro de una población determinada por ejemplo la mexicana. La segunda de "selección natural" que propone la selección de los genes polimórficos sobre los monomórficos. Es probable que ambos mecanismos participen en el desarrollo del polimorfismo que caracteriza a los genes del MHC (29).

ASOCIACION DE MARCADORES GENETICOS DEL HLA CON CUCI.

Desde 1972 se conoce el papel del HLA en la susceptibilidad genética para el desarrollo de enfermedad inflamatoria intestinal (30). La evidencia se apoya en distintas las variaciones en la incidencia de la enfermedad por grupos étnicos, en la agregación familiar, la mayor concordancia en gemelos monocigóticos que en dicigóticos y la frecuencia aumentada de CUCI en ciertos síndromes genéticos (31,32).

Existen diversos marcadores genéticos del HLA asociados en diferentes características clínicas en pacientes con CUCI así por ejemplo, desde 1982 se reportó el primer estudio que relacionó la enfermedad con los genes clase II del MHC (33). A partir de entonces numerosos estudios han demostrado aumento de ciertos antígenos HLA con CUCI, pero variando el antígeno asociado según el grupo étnico por ejemplo, el HLA-B52 y DR2 en japoneses (33, 34), el HLA-DR3 en caucásicos (35-37) y el HLA-B35 en judíos (38), y los antígenos HLA-A19, A33, y Cw6 en asiáticos (39).

Desde 1993 (34) se iniciaron los estudios moleculares de genes clase II del MHC. Así, Roussomoustakaki M (40) reportó asociación con el alelo HLA-DRB1*0103 en caucásicos sometidos a proctocolectomía y con manifestaciones extraintestinales. Por lo que la presencia del alelo DRB1*0103 se ha propuesto como marcador del curso clínico grave.

En otro estudio se demostró asociación del haplotipo HLA-DR3-DQ2 (DRB1*0301-DQB1*0201) con pancolitis (41).

Trachtenberg EA y cols. (42) encontraron en caucásicos incremento significativo de los haplotipos HLA-DRB1*0103-DQA1*0501-DQB1*0301 y del HLA-DRB1*0103-DQA1*0101-DQB1*0501 así como del alelo HLA-DRB1*1502 con CUCI independiente de las manifestaciones clínicas.

Orchard TR y cols (43) describieron manifestación extraintestinal específicamente artropatía periférica con los alelos HLA-DRB1*0103 ($p < 0.0001$, RR=12.1), B*35 ($p = 0.01$, RR=2.2), B*27 ($p = 0.001$, RR=4) y B*44 ($p = 0.01$, RR=2.1) en caucásicos.

Fernández-Arquero M y cols. (44) en pacientes españoles con pancolitis y colitis distal asociaron pancolitis con los alelos HLA-DRB1*0103 ($p = 0.02$, RR 5.1) y DR4 ($p = 0.009$, RR=3); y en aquéllos con colitis distal se observó asociación con HLA-DRB1*1501 ($p = 0.03$, RR= 1.9) y DRB1*0103 ($p = 0.03$, RR 3.8).

Por su parte en japoneses el HLA-DRB1*1502 está asociado con una forma clínica grave (45).

Yoshitake S y cols. (46) en japoneses encontraron asociación con los alelos HLA-DRB1*1502 [$p < 1 \times 10^{-8}$, RR 4.51], DQA1*0103 [$p = 1 \times 10^{-5}$, RR=3.72] y DQB1*0601 [$p = 1 \times 10^{-5}$, RR=3.78].

Folwaczny C. y cols (47) en alemanes encontraron asociación con el alelo HLA-DRB1*12 ($p = 0.01$). Bouma G y cols. (48) encontraron en Holandeses asociación con HLA-DRB1*0103 (6% vs 0.2%; $p = 0.0002$, RR=27.6) y con DRB1*15 (41% vs 26%; $p = 0.001$; RR=2.0). Particularmente en mujeres (53% vs 24%; $p < 0.0001$; RR=3.5) y de acuerdo a la localización de la enfermedad, el 100% de los pacientes que fueron positivos al HLA-DRB1*0103 tuvieron pancolitis ($p < 0.002$, RR=33.5), y más aún este alelo también estuvo

incrementado de manera significativa en pacientes sometidos a colectomía ($p < 0.0002$, $RR=84$).

Uyar FA y cols (49) en Turquía encontraron asociación con HLA-DRB1*1502 ($p=0.02$, $RR=2.9$) y protección con el HLA-DRB1*13 ($p=0.03$, $RR= 0.38$). También encontraron asociación entre la positividad al p-ANCA y el HLA-DRB1*0701 ($p=0.005$).

Myung SJ y cols (50) en Corea del Sur reportaron asociación entre el HLA-DRB1*1502 y la CUCI así como con la positividad a p-ANCA e inclusive con aquellos pacientes a quienes se les realizó proctocolectomía por refractariedad al tratamiento médico, lo cual apoya a lo reportado en poblaciones japonesas.

En suma los reportes anteriores sostienen que existen diferentes alelos clase II del *locus* HLA-DRB1 los cuales están asociados con la susceptibilidad genética y diversas manifestaciones clínicas o gravedad de la misma en grupo étnicos y hace pertinente su estudio en mexicanos.

La CUCI es una enfermedad heterogénea genéticamente es decir, pueden estar involucrados diversos genes localizados dentro del MHC (51), en este sentido se ha demostrado que los genes clase III codifican para el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa) y que a su vez se asocia con varias enfermedades autoinmunes (52), incluyendo a la CUCI, donde se muestra incremento del alelo TNF*2 del promotor del factor de necrosis tumoral alfa en pacientes con pancolitis.

Otros genes codificados en la región clase III del MHC como son las proteínas del complemento C2, factor b, C4A y C4B parecen influir en la susceptibilidad. En un estudio realizado en mexicanos con CUCI, se encontró asociación con el complotipo SC30 (Bf*S-C2*C-C4A*3-C4B*0) (53) lo cual sugiere que la activación del sistema del complemento podría influir en la fisiopatogenia de la enfermedad.

Con base a lo anterior, este estudio pretendió analizar el papel de los alelos del *locus* HLA-DRB1 en mexicanos con CUCI.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La CUCI es una enfermedad cuya etiología se desconoce. Se ha demostrado que existen diferentes alelos del *locus* HLA-DRB1 asociados con la enfermedad y con ciertas características clínicas sobre todo de gravedad, los cuales varían de acuerdo al grupo étnico estudiado. Los aspectos genéticos son relevantes ya que permiten conocer el mecanismo de producción de la enfermedad y en caso de encontrarse algún marcador genético de gravedad permitirá un tratamiento más específico.

Las preguntas elementales a dicho planteamiento son:

¿Qué alelos del HLA-DRB1 se asocian con CUCI en mestizos mexicanos?

¿Qué alelos del HLA-DRB1 se asocian con características clínicas de gravedad en CUCI, en particular con manifestaciones extraintestinales, extensión de la enfermedad y la realización de proctocolectomía ?

JUSTIFICACION.

La CUCI es una enfermedad de causa multifactorial y recientemente se ha explorado el papel de marcadores genéticos en su etiopatogenia. La importancia de este trabajo radica primordialmente en la identificación de genes del MHC específicamente del *locus* HLA-DR que estuvieron asociados con la susceptibilidad a CUCI en población mestizo mexicana.

No existen estudios en Latinoamérica por lo que es interesante estudiar la población mestiza mexicana ya que su estructura difiere de otras poblaciones por la influencia indígena y donde se puede definirse si los genes de susceptibilidad son propios o adquiridos por el mestizaje con caucásicos o asiáticos.

OBJETIVOS.

PRIMARIO:

- Determinar la frecuencia génica de los alelos HLA-DRB1 en pacientes mestizos mexicanos con CUCI.

SECUNDARIO:

- Analizar si algún alelo HLA-DRB1 se relaciona con manifestaciones graves de CUCI tales como la extensión (pancolitis), manifestaciones extraintestinales y proctocolectomía como resultado de refractariedad al tratamiento médico o a la presencia de complicaciones locales agudas.

HIPOTESIS.

PRIMARIA:

NULA: La frecuencia génica de los alelos HLA-DRB1 en pacientes con CUCI es semejante a la encontrada en población general.

ALTERNA: La frecuencia génica de los alelos HLA-DRB1 es diferente en pacientes con CUCI comparada con la población general, por lo que se encuentra asociación entre ambos.

SECUNDARIA:

NULA: La frecuencia génica de los alelos HLA-DRB1 en CUCI es similar a la población normal y por lo tanto, no se encuentra asociación alguna con las manifestaciones clínicas graves de la CUCI (extensión, manifestación extraintestinal, proctocolectomía).

ALTERNA: La frecuencia génica de los alelos HLA-DRB1 es diferente en los pacientes con CUCI con respecto a los de la población normal y por lo tanto se encuentra asociación entre dichos alelos y las manifestaciones clínicas graves de la CUCI (extensión, manifestación extraintestinal, proctocolectomía).

PACIENTES Y METODOS.

a) Diseño del estudio: Casos y controles.

b) Población:

Casos:

Se estudiaron 67 pacientes consecutivos mestizos mexicanos con diagnóstico confirmado por histología de CUCI pertenecientes a la consulta externa de Gastroenterología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

Los pacientes cumplieron con las siguientes características:

Mestizo Mexicano: Es aquél individuo nacido en México así como sus dos últimas generaciones (padres y abuelos), según las estimaciones de mestizaje tiene una proporción de 56% genes amerindios, 40% genes de origen caucásico y 4% de genes de origen negro (54-56).

• CRITERIOS DE INCLUSION.

1. Pacientes adultos.
2. Diagnóstico de CUCI confirmado por histología caracterizado por infiltrado inflamatorio por neutrófilos, linfocitos, células plasmáticas, macrófagos, eosinófilos y mastocitos. Ulceración y aplanamiento de las células epiteliales. Congestión vascular de la submucosa así como edema de la lámina propia con dilatación y congestión de los capilares.
3. Que sean individuos nacidos en México y con por lo menos 2 generaciones previas también nacidas en México.

- **CRITERIOS DE EXCLUSION.**

1. Otro tipo de enfermedades inflamatorias intestinales tales como: Enfermedad de Crohn, colitis indeterminada, Colitis infecciosa, colitis microscópica.
2. Asociación con otras enfermedades autoinmunes tales como hepatitis autoinmune, anemia hemolítica, púrpura trombocitopénica idiopática, DM tipo 1, tiroiditis autoinmune, miastenia gravis, psoriasis, lupus eritematoso generalizado, artritis reumatoide.
3. Que no deseen participar en el estudio.

- **CRITERIO DE ELIMINACION.**

1. Pacientes captados en quienes no se obtuvo DNA a partir de la muestra sanguínea.

c) Procedimiento:

- Una vez seleccionados los casos, se les aplicó un cuestionario enfocado a la identificación de características demográficas, clínicas y bioquímicas de la enfermedad según se ilustra en la hoja de recolección de datos (Anexo 1) también se realizó exploración física detallada.
- En caso de que los pacientes presentaran sintomatología ocular, dermatológica y/o dermatológica se canalizaron con el especialista correspondiente para establecer el diagnóstico correcto de la manifestación extraintestinal existente.
- La extensión de la enfermedad fue determinada mediante por colonoscopia larga con objeto de valorar el grado de actividad macroscópica así como efectuar la toma de biopsias de todos los segmentos colónicos.
- El diagnóstico fue confirmado por hallazgos histopatológicos de acuerdo a la opinión de 2 patólogos expertos en el área.
- Una vez confirmados los hallazgos y características clínicas de la enfermedad, se obtuvo el consentimiento informado para participar en el estudio (Anexo 2).
- Los casos y controles fueron interrogados respecto a antecedentes heredo-familiares y personales de enfermedades autoinmunes según criterios clínicos establecidos para cada una de ellas (anexo 3).
- Se tomó una muestra sanguínea venosa periférica de aproximadamente 5 ml de sangre, colocándose en un tubo con anticoagulante con EDTA al 2%.
- Se extrajo el DNA a partir de células mononucleares mediante la técnica de Salting Out, la cual se describe detalladamente en el anexo 4.
- Se amplificó la región del locus HLA-DRB1 por medio de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), según se describe la técnica en el anexo 4.
- Se realizó el marcaje de las sondas e hibridación en membranas de nylon, según descripción de las técnicas en el anexo 4.

Controles:

Se estudiaron 99 individuos adultos sanos, nacidos en México al igual que sus dos últimas generaciones; cuyo origen y residencia son del D.F. y área metropolitana, sin la presencia de antecedentes heredofamiliares de enfermedades autoinmunes tales como tiroiditis autoinmune, diabetes mellitus tipo 1, artritis reumatoide, lupus eritematoso generalizado, escleroderma, síndrome de Sjögren y de enfermedad inflamatoria intestinal (CUCI y Enf. de Crohn), según criterios clínicos (anexo 3).

d) Análisis estadístico:

Se utilizó estadística descriptiva. Las variables continuas se analizaron utilizando la prueba t de Student y para variables categóricas la prueba de Chi-cuadrada.

Se realizó en forma inicial el cálculo de las frecuencias génicas, la cual se obtuvo tomando en cuenta la frecuencia de cada alelo con respecto a un total de $2N$, ya que uno procede del padre y otro de la madre.

El análisis de asociación de la frecuencia de cada alelo se realizó mediante tablas de contingencia de 2×2 y se utilizó las pruebas de Chi-cuadrada de Pearson y exacta de Fisher cuando existan frecuencias menores de 5 en ésta última. La fuerza de asociación se determinó por medio de una razón de momios >1 la cual será positiva o de susceptibilidad y <1 negativa o de protección. La significancia estadística fue tomada con un valor de $p < 0.05$. El valor de p fue corregido de acuerdo al número de alelos estudiados mediante la Prueba de Bonferroni para comparaciones múltiples.

Para la correlación de las variables clínicas con los marcadores genéticos, se realizó análisis univariado y posteriormente multivariado del tipo de la regresión logística para ajustar las variables confusoras usando el paquete estadístico SPSS versión 10.0.

TAMAÑO DE LA MUESTRA.

Se calculó en base a las fórmulas descritas por Stanley Lemeshow (57).

En la primera de ellas está enfocada a calcular la frecuencia del alelo HLA-DR3 en los pacientes con CUCI; se consideró este alelo debido a que se considera marcador de autoinmunidad. La frecuencia del DR3 en la población normal mestiza mexicana (p_2) es del 5%. Por otro lado, se tomó una razón de momios de 4 en base al promedio de las razones de momios reportadas en estudios previos.

Fórmulas:

$$p_1 = \frac{(RM) p_2}{(RM) p_2 + (1-p_2)}$$

Llevándose a cabo las operaciones correspondientes se obtuvo que la frecuencia del alelo DR3 en el grupo de pacientes con CUCI es del 17%.

En la segunda fórmula, Se tomaron las frecuencias en los dos grupos, con un poder del 80% y un valor de alfa de 0.05

$$n = \frac{[Z_{1-\alpha/2} \sqrt{2 p_2 (1-p_2)} + Z_{1-\beta} \sqrt{p_1 (1-p_1) + p_2 (1-p_2)}]^2}{(p_1 - p_2)^2}$$

Nivel de significancia estadística $\alpha = 0.05$

Poder = 0.80

RM = 4.0

$p_1 = .17$

$p_2 = .05$

$Z_{1-\alpha/2} = 1.96$

$Z_{1-\beta} = .84$

Después de realizar los procedimientos aritméticos correspondientes, se consideró

un total de 67 sujetos con CUCI para demostrar o refutar la asociación.

RESULTADOS

Características demográficas:

Se estudiaron 67 pacientes mestizo mexicanos con diagnóstico confirmado por histopatología de CUCI; 34 mujeres (50.7%) y 33 hombres (49.3%), cuyo promedio de edad fue de 38.1 años (18-68).

El lugar de origen y residencia estuvo distribuido en 34 pacientes provenientes del D.F. y los 33 restantes (49.3%) del interior de la república.

Ninguno de los pacientes reveló antecedentes heredo-familiares de alguna enfermedad autoinmune incluyendo enfermedad inflamatoria intestinal así como tampoco tenían alguna enfermedad de carácter autoinmune de manera concomitante a la CUCI.

En 42 pacientes (62.7%) no tenían antecedentes de tabaquismo; mientras que 21 de ellos (31.3%) tenían más de 1 año de haber dejado de fumar y sólo 4 pacientes (6%) presentaban tabaquismo activo.

Características Clínicas:

El promedio de edad al diagnóstico de la enfermedad fue de 30.3 años; con evolución promedio de 8.1 años (1 a 33). En relación a la extensión de la enfermedad, ésta fue establecida por colonoscopia larga y confirmada por histopatología; así, se encontró que 40 pacientes (59.7%) mostraron pancolitis mientras que los otros 27 solo colitis distal o localizada (40.3%).

La frecuencia y localización de las manifestaciones extraintestinales se ilustran en la tabla 1. Cabe mencionar que la sacroiliitis fue establecida mediante clínica y radiología.

Se encontró que en 16 pacientes (23.9%) fueron sometidos a proctocolectomía total, de los cuales todos tenían pancolitis; los motivos para la realización de dicho procedimiento quirúrgico fueron: refractariedad al tratamiento convencional (13.4%), perforación (6%), displasia grave (3%) y megacolon tóxico (1.5%).

Alelos de HLA-DRB1 en pacientes con CUCI.

En el grupo total de pacientes, se encontró incremento significativo de la frecuencia génica del alelo HLA-DR1 ($pC=0.0003$; $RM=3.9$; $IC95\%: 1.69-9.14$) comparados con controles sanos. Cabe mencionar, que el alelo HLA-DR2 también se encontró incrementado en el grupo de pacientes ($pC=0.01$; $RM=3.8$ $IC95\%: 1.14-4.62$) comparado con controles. La frecuencia del resto de los alelos del HLA-DR se distribuyeron de manera semejante en casos y controles (tabla 2).

Al realizar la determinación de los subtipos del HLA-DRB1*01 encontramos que el alelo HLA-DRB1*0103 fue el único incrementado de manera significativa en los pacientes sometidos a colectomía comparado con aquéllos que no requirieron dicho procedimiento quirúrgico ($pC=0.005$, $RM= 7.2$; $IC95\%: 1.56-34.7$) según se observa en la tabla 2. Los otros subtipos de este alelo tales como el HLA-DRB1*0101 y *0102 no mostraron diferencias estadísticamente significativas en cada una de las manifestaciones clínicas como proctocolectomía, extensión y manifestaciones extraintestinales.

En la tabla 3 se muestra el análisis de subgrupos de acuerdo a la extensión de la enfermedad y a los subtipos del HLA-DR2; aquí se encontró que el alelo HLA-DRB1*15 está incrementado de manera significativa en aquéllos pacientes con pancolitis al compararse con aquéllos con afección distal ($pC=0.003$, $RM=12.23$, $IC95\%: 1.6-256.2$). No se encontraron diferencias con respecto a este alelo y las otras dos manifestaciones clínicas (proctocolectomía y manifestaciones extraintestinales).

El análisis con respecto de cada una de las manifestaciones extraintestinales como son colangitis esclerosante primaria, artritis, pioderma gangrenoso, uveítis, eritema nodoso, espondilitis anquilosante, sacroiliitis no mostró asociación alguna con los genes HLA.

Al realizar ajuste por variables confusoras como edad, género, y tabaquismo a través del análisis univariado, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Análisis univariado y multivariado para variables involucradas en cada una de las manifestaciones clínicas:

1. Proctocolectomía: El univariado mostró 2 variables significativas pancolitis y la presencia del HLA-DR1 como posibles factores asociados, sin embargo, en la regresión logística las variables no mantuvieron significancia estadística.

2. Pancolitis: En el análisis univariado se encontró que la presencia de manifestación extraintestinal y el HLA-DR15 se asociaron de manera significativa; en el análisis multivariado del tipo de la regresión logística, ambas variables permanecieron con significancia estadística.

3. Manifestación extraintestinal: La pancolitis mostró significancia estadística tanto en el análisis uni como en el multivariado, sin que estuvieran asociados otras variables demográficas y clínicas con esta manifestación.

DISCUSION

Los marcadores inmunogenéticos clase II del HLA tales como el DR1 y DR2 están asociados con la susceptibilidad genética para el desarrollo de CUCI en pacientes mestizos mexicanos. Como se nota, el marcador que cuenta con mayor fuerza de asociación es el HLA-DR1 con $RM=3.9$ vs 2.29 del HLA-DR2. Estos resultados confirman otros hallazgos reportados en la literatura en diversas poblaciones caucásicas y asiáticas.

Es el primer estudio en Latinoamericanos y confirma lo reportado por Toyoda H (34) en japoneses, quien mostró asociación con el HLA-DR2 ($p=0.008$; $RM=2.6$) y HLA-DR1 ($p=0.02$; $RM=2.38$), mismos que aparecieron en el presente trabajo con razón de momios de 2.29 y 3.9 respectivamente.

En otro estudio realizado por Satsangi J en ingleses (36), el HLA-DR1 (HLA-DRB1*0103) se asoció con $RM=2.86$ dicho alelo también se asoció con pancolitis y la necesidad de colectomía.

El presente estudio confirmó lo encontrado por Roussomoustakaki en caucásicos de EUA (40) donde se reportó asociación del HLA-DR1 (HLA-DRB1*0103) con CUCI ($RM=5.72$). Más aún al analizar por subgrupos, encontraron asociación de dicho alelo con proctocolectomía ($p<0.0001$; $RM=5$), pancolitis ($p<0.0001$, $RM=5.72$) y con manifestaciones extraintestinales ($p<0.0001$; $RM=8.95$). En el presente trabajo el HLA-DRB1*0103 se asoció solo con proctocolectomía ($p=0.005$, $RM=7.2$; $IC95\%: 1.56-34.7$) y no confirmó la asociación con las otras manifestaciones extraintestinales.

El estudio en Españoles que describió asociación del HLA-DRB1*0103 con pancolitis (45), no se confirmó en la población mestiza mexicana lo cual es interesante por el mestizaje de españoles con mexicanos donde el marcador asociado con esta característica clínica fue el HLA-DRB1*15 lo que sugiere que el mestizaje es fundamental para que se presente pancolitis.

En el presente trabajo confirmó lo reportado por Bouma en pacientes holandeses (48) quien describió asociación de los alelos HLA-DRB1*0103 y HLA-DRB1*15 con CUCI. El análisis por subgrupos evidenció que el HLA-DRB1*0103 está asociado con proctocolectomía mientras que la pancolitis lo está con los alelos, el HLA-DRB1*0103 y el HLA-DRB1*15, mientras que en la población mestiza mexicana se documentó que el HLA-DRB1*0103 sólo se asoció con proctocolectomía y la pancolitis con el HLA-DRB1*15.

Por otro lado, existen trabajos en población japonesa que reportan asociación de CUCI con el alelo HLA-DR2 (DRB1*15); así por ejemplo, Yoshitake (46) encontró que el HLA-DRB1*15 se asocia con la susceptibilidad a la enfermedad mientras que en mestizo mexicanos, este alelo se asoció con la susceptibilidad a la enfermedad así como con la extensión de manera específica con pancolitis.

Futami (42) también confirmó dicha asociación descrita en japoneses. La susceptibilidad en mexicanos probablemente está influida por la ancestral relación genética con poblaciones orientales o con migraciones del siglo XVI. Más aún, Masuda y cols (58) también reportaron en japoneses asociación del HLA-DRB1*15 con pancolitis y enfermedad refractaria que llevó a proctocolectomía, lo cual confirma tanto estudios previos en Japón como el estudio en mexicanos y sugiere que este marcador inmunogenético está asociado con pancolitis, más no con proctocolectomía.

Finalmente en un meta-análisis realizado por Stokkers y cols. (59) donde se conjuntaron 29 estudios en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal incluidos CUCI y Enfermedad de Crohn en el período de 1980 a 1998, se mostró que el HLA-DR2 está asociado con CUCI (RM=2.0; IC95%: 1.52-2.63) y que el subtipo HLA-DRB1*15 tiene mayor fuerza de asociación (RM=3.74; IC95%: 2.2-6.38); al mismo tiempo que el alelo HLA-DRB1*0103 está fuertemente asociado con la susceptibilidad genética al desarrollo de enfermedad inflamatoria intestinal (RM=3.42 e IC95%: 1.52-7.69).

Es importante mencionar que cada uno de los marcadores señalados se estudiaron en poblaciones con diverso origen étnico, lo que permitió identificar que en europeos y norteamericanos predomina el alelo HLA-DR1 (subtipo el HLA-DRB1*0103), mientras que en orientales el marcador asociado es el HLA-DR2 subtipo HLA-DRB1*15.

El presente estudio constituye el primero realizado en Latinoamérica y confirma hallazgos reportados en poblaciones caucásicas en cuanto al alelo HLA-DRB1*01 y el HLA-DRB1*15 en orientales, sin embargo, la frecuencia del HLA-DR1 es del 5% en la población normal mestiza mexicana mientras que en los grupos indígenas como los mazatecos es del 0.7% y en los nahuas del 0% (60) lo que sugiere una relación intensa de poblaciones orientales con amerindios.

Por otro lado, el HLA-DRB1*15 tiene una frecuencia del 6.5% en la población normal mestiza mexicana y en las poblaciones indígenas como los mazatecos es del 4.9% y en los nahuas del 0.6% (60) confirmando con ello la influencia oriental en Latinoamérica.

Dado a que ambos marcadores HLA-DR1 y HLA-DR15 lo encontramos con frecuencias génicas elevadas en pacientes con CUCI (17% y 15% respectivamente) con respecto a la población mestiza mexicana e indígena, ya que la frecuencia del alelo HLA-DRB1*0103 también estuvo elevada en pacientes específicamente aquéllos sometidos a proctocolectomía, se sugiere que estos alelos fueron adquiridos a través del mestizaje con poblaciones caucásicas y asiáticas.

Para confirmar esto último es necesario estudiar familias para construir haplotipos B-DR-DQ para sustentar el origen étnico de las poblaciones. Lo anterior podría apoyarse en estudios realizados en población indígena y mestiza mexicana (61).

CONCLUSIONES

- Los genes HLA-DR1 y DR2 pertenecientes a la clase II del MHC están asociados con la susceptibilidad genética al desarrollo de la CUCI en esta población.
- La gravedad de la enfermedad definida por proctocolectomía y pancolitis se asocia con los alelos HLA-DRB1*0103 y DRB1*15 respectivamente.

BIBLIOGRAFIA.

1. DeDombal FT. Ulcerative colitis: definition, historical background, aetiology, diagnosis, natural history, and local complications. *Postgrad Med J* 1968; 44: 684-92.
2. Langholz E, Munkholm P, Davidsen M, Binder V. Course of ulcerative colitis: Analysis of changes in disease activity over years. *Gastroenterology* 1994; 107: 3-11.
3. Mendeloff AI, Calkins BM. The epidemiology of idiopathic inflammatory bowel disease. En Kirsner JB, Shorter RG (eds), *Inflammatory bowel disease*, 4a ed. Philadelphia, Lea & Febiger, 1995; pp. 31-68.
4. Koutrobakis I, Manousos ON, Mewwisen SGM, Pena AS. Environmental risk factors in inflammatory bowel disease. *Hepatogastroenterology* 1996; 43: 381-93.
5. Thomas GA, Rhodes J, Green JT. Inflammatory bowel disease and smoking. A review. *Am J Gastroenterol* 1998; 93: 144-9.
6. Somerville KW, Logan RFA, Edmond M, Langman MJS. Smoking and Crohn's disease. *BMJ* 1984; 289: 954-6.
7. Lee JCW, Lennard-Jones JE. Inflammatory bowel disease in 67 families each with three or more affected first degree relatives. *Gastroenterology* 1996; 111: 587-93.
8. Pietro GA, Friedman LS. Epidemiology and the natural course of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am* 1999; 28: 255-81.
9. Rhodes JM: Colonic mucus and mucosal glycoproteins: The key to colitis and cancer? *Gut* 1989; 30: 1660-6.
10. Roedinger WE, Duncan A, Kapaniris O, et al. Reducing sulfur compounds of the colon impair colonocyte nutrition: Implications for ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1993; 104: 802-9.

11. Roedinger WE. The colonic epithelium in ulcerative colitis: An energy-deficiency disease? *Lancet* 1980; 2:712-5.
12. Isaacs KL, Sartor RB, Haskill S. Cytokine messenger RNA profiles in inflammatory bowel disease mucosa detected by polymerase chain reaction amplification. *Gastroenterology* 1992; 103: 1587-95.
13. Sanderson JD, Moss MT, Tizard ML, et al. *Mycobacterium paratuberculosis* DNA in Crohn's disease tissue. *Gut* 1992; 33: 890-6.
14. Sartor RB: Treating IBD by altering luminal contents: Rationale and response. In Rachmilewitz D (ed): *Inflammatory Bowel Diseases*. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 1994, pp177-91.
15. Levine JB, Lukawski-Trubish D. Extraintestinal considerations in inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am* 1995; 24: 633-52.
16. Palli D, Trallori G, Saieva C, et al. General and cancer specific mortality of a population based cohort of patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 1998; 42: 175-87.
17. Katz JP, Lichtenstein GR. Rheumatologic manifestations of gastrointestinal diseases. *Gastroenterol Clin North Am* 1998; 27: 533-62.
18. Orchard TR, Wordsworth BP, Jewell DP. Peripheral arthropaties in inflammatory bowel disease: their articular distribution and natural history. *Gut* 1998; 42: 387-9.
19. Allez M, Modigliani R. Clinical features of inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2000; 16: 329-36.
20. Raj V, Lichtenstein DR. Hepatobiliary manifestations of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am* 1999; 28: 491-513.

21. Dubinsky MC, Seidman EG. Diagnostic markers of inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2000; 16: 337-42.
22. Trowsdale J, Ragoussis J, Campell RD. Map of the human major histocompatibility complex (MHC). *Immunology Today* 1991; 12:443-6.
23. Heinriche H, Orr HT. HLA non A, B, C class I genes: their structure and expression. *Immunol Res* 1990; 9:265-74.
24. White P, New M, Dupont B. Structure of human steroid 21-hydroxylase genes. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1986; 83:5111-5.
25. Matzuzaka Y, Makino S, Nakajima K, Tonizawa M, Oka A, Bahram S, Kulski JK, Tamiya G, Inoko H. New polymorphic microsatellite markers in the human MHC class III region. *Tissue Antigens* 2001; 57: 397-404.
26. Marsch SG. Nomenclature for factors of the HLA system, update March 2002, Compiled by: *Human Immunology* 2002; 63: 515-6.
27. Marsh SG, Bodmer JG, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, Erlich HA, Hansen JA, Mach B, Mayr WR, Parham P, Petersdorf EW, Sasazuki T, Schreuder GM, Strominger JL, Sveigaard A, Terasaki PI. Nomenclature for factors of the HLA system, 2000. *Tissue Antigens* 2001 Mar;57(3):236-83.
28. Marsh SG. Nomenclature for factor of the HLA system. WHO Nomenclature Committee for factors of the HLA system. *Tissue Antigens* 2000; 56:565-6.
29. Klein J. Of HLA, types and selection: an assay on evolution of MHC and parasites. *Hum Immunol* 1991; 30: 247-58.
30. Gleeson M, Walker J, Wentzel J, Chapman J, Harris R. Human leukocyte antigens in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gut* 1972; 13: 438-40.

31. Satsangi J, Rosenberg WMC, Jewell DP. The prevalence of inflammatory bowel disease in relatives of patients with Crohn's disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1994; 32: 413-6.
32. Tysk C, Lindberg E, Järnerot G, Flodérus-Myrhed B. Ulcerative colitis and Crohn's disease in an unselected population of monozygotic and dizygotic twins. A study of heritability and the influence of smoking. *Gut* 1988; 29:990-6.
33. Asakura h, Tsuchiya M, Aiso S. Association of the human leukocyte DR2 antigen with Japanese ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1982; 82:413-8.
34. Toyoda H, Wang SJ, Yang H. Distinct association of HLA class II genes with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1993; 104:741-8.
35. Duerr RH, Neigut DA. Molecularly defined HLA-DR2 alleles in ulcerative colitis and an anti-neutrophil cytoplasmic antibody positive subgroup. *Gastroenterology* 1995; 108: 423-7.
36. Satsangi J, Welsh KI, Bunce M, Julier C, Farrant JM, Bell JI. Contribution of genes of the major histocompatibility complex to susceptibility and disease phenotype in inflammatory bowel disease. *Lancet* 1996; 347:1212-7.
37. Delpre G, Kadish U, Gazit E. HLA antigens in ulcerative colitis and Crohn's disease in Israel. *Gastroenterology* 1980; 78:1452-7.
38. Biemond I, Burnham WR, D'Amaro J. HLA-A and B antigens in inflammatory bowel disease. *Gut* 1986; 27:934-41.
39. Habeeb MA, Rajalingam R, Dhar A, Kumar A, Sharma MP, Mehra NK. HLA association and occurrence of autoantibodies in Asian Indian patients with ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 1997;92:772-76.

40. Roussomoustakaki M, Satsangi J, Welsh K. Genetic markers may predict disease behavior in patients with ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1997; 112:1845-53.
41. Satsangi J, Welsh KI, Bunce M, Julier C, Farrant JM, Bell JI, Jewell DP. Contribution of genes of the major histocompatibility complex to susceptibility and disease phenotype in inflammatory bowel disease. *Lancet* 1996; 347: 1212.
42. Trachtenberg EA, Yang H, Hayes E, Vinson M, Lin C, Targan SR, Tyran D, Erlich H, Rotter JI. HLA class II haplotype associations with inflammatory bowel disease in Jewish (Ashkenazi) and non-Jewish caucasian populations. *Hum Immunol* 2000; 61:326-33.
43. Orchard TR, Thiagaraja S, Welsh KI, Wordsworth BP, Hill Gaston JS, Jewell DP. Clinical phenotype is related to HLA genotype in the peripheral arthropathies of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2000; 118:274-8.
44. Fernandez-Arquero M, Lopez-Nava G, Garcia Paredes J, Martinez A, De la Concha EG, Figueredo MA, Conejero L, Vigil P, Diaz Rubio M. Pancolitis and genetic markers in the Spanish population. *Rev Esp Enferm Dig* 1999; 91:269-76.
45. Futami S, Aoyama N, Honsako Y. HLA-DRB1*1502 allele, subtype of DR15, is associated with susceptibility to ulcerative colitis and its progression. *Dig Dis Sci* 1995; 40:814-8.
46. Yoshitake S, Kimura A, Okada M, Yao T, Sasazuki T. HLA class II alleles in Japanese patients with inflammatory bowel disease. *Tissue Antigens* 1999; 53:350-8.
47. Folwaczny C, Zahn R, Brunnler G, Albert E, Koenig A, Noehl N, Loeschke K, Fricke H. Lack of association between HLA-DRB1 alleles of the major histocompatibility

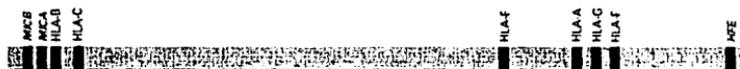
- complex and p-ANCA status or clinical characteristics in patients with ulcerative colitis. *Z Gastroenterol* 1999; 37:133-40.
48. Bouma G, Crusius JB, Garcia-Gonzalez MA, Meijer BU, Hellemsans HP, Hakvoort RJ, Schreuder GM, Kostense PJ, Meuwissen SG, Pena AS. Genetic markers in clinically well defined patients with ulcerative colitis. *Clin Exp Immunol* 1999; 115:294-300.
49. Uyar FA, Imeryuz N, Saruhan-Direskeneli G, Ceken H, Ozdogan O, Sahin S, Tozun N. The distribution of HLA-DRB alleles in ulcerative colitis patients in Turkey. *Eur J Immunogenet* 1998; 25:293-6.
50. Myung SJ, Yang SK, Jung HY, Chang HS, Park JB, Hong WS, Kim JH, Min Y. HLA DRB1*1502 confers susceptibility to ulcerative colitis, but is negatively associated with its intractability: a Korean study. *Int J Colorectal Dis* 2002; 17:233-7.
51. Lashner BA. Genetic heterogeneity in ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 1994; 89: 1927-8.
52. Brinkman BMN, Zujidgeest P, Kaijzel EL, Breedveld FC, Vermeij CL. Relevance of the tumour necrosis factor alpha (TNF- α) -308 promotes polymorphism in TNF α regulation. *J Inflamm* 1996; 46: 32-41.
53. Yamamoto-Furusho JK, Cantú C, Vargas-Alarcón G, Andrade F, Zúñiga J, Rodríguez J, Boom R, Granados J. Complotype SC30 is associated with susceptibility to develop ulcerative colitis in Mexicans. *J Clin Gastroenterol* 1998; 27:178-9.
54. Lisker R, Pérez-Briseño R, Granados J, et al. Gene frequencies and admixtures estimates in the State of Puebla, Mexico. *Am J Phys Anthropol* 1988; 76: 331-5.
55. Lisker R, Pérez-Briseño R, Granados J, et al. Gene frequencies and admixtures estimates in a Mexico City population. *Am J Phys Anthropol* 1988; 71: 203-7.

56. Lisker R, Pérez-Briseño R, Ramírez E, et al. Gene frequencies and admixtures estimates in four Mexican urban centers. *Hum Biol* 1990; 62: 791-801.
57. Lemeshow S, Hosmer DW, Klar J, Lwanga SK. Adequacy of sample size in health studies. World Health Organization, New York, USA, 1990.
58. Masuda H, Nakamura Y, Tanaka T, et al. Distinct relationship between HLA-DR genes and intractability of ulcerative colitis. *Am J Gastroenterology* 1994; 89: 1957-62.
59. Stokkers PCF, Reitsma PH, Tytgat GNJ, van Deventer SJH. HLA-DR and DQ phenotypes in inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Gut* 1999; 45: 395-401.
60. Vargas-Alarcón G, Hernández-Pacheco G, Gamboa R, et al. Polymorphism and distribution of HLA-DR2 alleles in Mexican populations. *Hum Immunology* 2001; 62: 286-91.
61. Arnaiz-Villena A, Vargas-Alarcón G, Granados J, et al. HLA genes in Mexican Mazatecans, the peopling of the Americas and the uniqueness of Amerindians. *Tissue Antigens* 2000; 56: 405-16.
62. Miller S, Dykes D, Polesky H. A simple salting-out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16: 1215-20.
63. Todd JA, Bell JI, McDevitt HO. HLA-DQ beta gene contributes to susceptibility and resistance to insulin dependent diabetes mellitus. *Nature* 1987; 329:599-606.
64. Kimura A, Dong RP, Harada H, Sasazuki T. DNA typing of HLA class II genes in B-lymphoblastoid cell lines homozygous for HLA. *Tissue Antigens* 1992; 40: 5-15.
65. Bodmer JG, Marsch SGE, Albert ED, Bodmer WF, Dupont B, Erlich HA. Nomenclature for factors of HLA system. *Tissue Antigens* 1995; 46:1-18.

66. Kessler C, Holtke HJ, Selbi R, Burg J, Muhlegger K. Non radioactive labelling and detection of nucleic acids. A novel DNA labelling and detection system based on digoxigenina antidigoxigenina ELISA principle. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 1990; 371: 917-27.
67. Fernandez-Viña MA, Moraes ME, Stastny P. DNA typing for class II HLA antigens with allele-specific or group-specific amplification. III. Typing for 24 alleles of HLA-DP. *Human Immunol* 1991; 30:60,

FIGURA 1. MAPA DEL COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD

Gen HLA Clase I



Gen HLA Clase III



Gen HLA Clase II



Tabla 1. Frecuencia y localización de las manifestaciones extraintestinales en pacientes con CUCI.

Frecuencia:

Presente	27 (40.3%)
Ausente	40 (59.7%)

Localización:

Artritis periférica	15 (22.4%)
Colangitis esclerosante primaria	7 (10.4%)
Sacroiliítis	4 (6%)
Eritema nodoso	4 (6%)
Espondilitis anquilosante	1 (1.5%)
Úlceras orales	1 (1.5%)
Uveítis	1 (1.5%)
Pioderma gangrenoso	1 (1.5%)

Tabla 2. Alelos del HLA-DR por orden de frecuencia en los pacientes con CUCI.

HLA	INDIVIDUOS						
	CUCI N=134		SANOS N=198		pC	RM	IC 95%
	N	fg	n	fg			
DR2	25	0.186	14	0.090	0.10	2.29	1.14-4.62
DR1	23	0.171	10	0.05	0.003	3.9	1.69-9.14
DR4	23	0.171	47	0.237	0.19	0.67	0.38-1.16
DR8	15	0.111	33	0.165	0.22	0.63	0.33-1.21
DR14	11	0.082	21	0.109	0.46	0.75	0.33-1.71
DR7	11	0.082	22	0.111	0.38	0.81	0.31-1.61
DR13	10	0.074	10	0.05	0.36	1.52	0.56-4.08
DR11	9	0.067	20	0.100	0.28	0.64	0.26-1.54
DR3	5	0.037	11	0.055	0.44	0.66	0.19-2.11
DR10	3	0.03	1	0.005	0.15	4.51	0.41-113.8
DR12	0	0	2	0.01	0.51	0	0-6.03
DR9	0	0	3	0.015	0.27	0	0-3.3

IC= Intervalo de confianza

RM= Razón de momios

p= valor de p

N= Número de cromosomas

Tabla 3. Asociación entre los alelos HLA-DR y la extensión de la enfermedad.

	Pancolitis	Distal	<i>p</i> C	RM	IC95%
	N=80	N=54			
DR1	0.212	0.111	0.12	2.16	0.73-6.68
*0103	0.112	0.055	0.35	2.15	0.50-10.62
*0102	0.050	0.055	1.0	0.89	0.16-5.3
*0101	0.037	0.018	0.64	2.06	0.18-52.3
DR15	0.187	0.018	0.03	12.23	1.6-256.2
DR16	0.062	0.072	1.0	0.83	0.18-3.92

IC= Intervalo de confianza

RM= Razón de momios

p= valor de *p*

N= Número de cromosomas

Tabla 4. Asociación entre los alelos HLA-DR y la presencia de proctocolectomía.

	Proctocolectomía		<i>p</i> C	RM	IC 95%
	Sí N=32	No N=102			
DR1	0.281	0.137	0.60	2.46	0.85-7.05
*0103	0.218	0.049	0.03	5.4	1.39-21.93
*0102	0.062	0.049	0.66	1.31	0.16-9.1
*0101	0.062	0.019	0.24	5.33	0.32-35.01
DR15	0.156	0.107	0.53	1.53	0.42-5.36
DR16	0.031	0.078	0.68	0.38	0.02-3.2

IC= Intervalo de confianza

RM= Razón de momios

p= valor de *p*

N= Número de cromosomas

VARIABLES DE ESTUDIO

Variable	Tipo de variable	Definición
Edad	Continua	Edad en años cumplidos
Sexo	Dicotómica	0=Femenino 1= Masculino
Antecedentes heredero-familiares	Dicotómica	0= No 1= Sí
Tabaquismo	Ordinal	0=Nunca 1= Historia de tabaquismo 2= Fuma
Coexistencia de enfermedad autoinmune	Dicotómica	0= No 1= Sí
Edad al diagnóstico	Continua	Edad de la confirmación histopatológica
Tiempo de evolución	Continua	Años de padecer la enfermedad
Manifestaciones Extraintestinales	Dicotómica	0= No 1= Sí
Sitio de actividad	Nominal	Ver anexo 1
Colectomía	Dicotómica	0=No 1=Sí
Motivo de colectomía	Nominal	Ver anexo 1.
Alelo del HLA-DRB1	Dicotómica	0=Ausente 1=Presente

• **DEFINICIONES OPERACIONALES.**

1. Complicaciones extraintestinales: Es la presencia de sintomatología fuera del colon manifestada como la presencia de artritis aguda, sacroileítis, espondilitis anquilosante, uveítis anterior, epiescleritis, eritema nodoso, colangitis esclerosante primaria y pioderma gangrenoso.

2. Complicaciones agudas locales: Hemorragia masiva, megacolon agudo tóxico y/o perforación que amerite la realización de colectomía.

3. Proctocolectomía: Es la extirpación quirúrgica de todo el colon y recto.

4. Pancolitis: Es la afección de todo el colon y recto.

5. Colitis distal: Es la afección del colon desde el ángulo esplénico hasta el recto.

6. Falla al tratamiento convencional: Son aquéllos pacientes que a pesar con dosis óptimas de 5 aminosalicilatos, esteroides y/o azatioprina persisten con actividad de la enfermedad por más de 1 mes.

ANEXO 1.

HOJA DE RECOLECCION DE DATOS

ALELOS DEL HLA ASOCIADOS A LA SUSCEPTIBILIDAD DE DESARROLLAR COLITIS ULCEROSA CRÓNICA INESPECÍFICA (CUCI) EN PACIENTES MESTIZO MEXICANOS.

1. Nombre: _____

2. Registro:

3. Edad:

4. Sexo: 1 Masculino 2 Femenino

5. Lugar de origen: _____

6. Antecedentes familiares con CUCI:

1. Sí.
2. No

7. Tabaquismo:

1. Nunca.
2. Última vez hace menos de 3 meses.
3. Última vez hace más de 3 meses
4. Actualmente

8. Coexistencia con otra enfermedad autoinmune:

1. Sí ¿Cuál? _____
2. No

9. Edad al diagnóstico de CUCI: _____

10. Confirmación histopatológica de CUCI:

1. Sí
2. No

11. Tiempo de evolución (años):

12. Extensión de la enfermedad:

1. Pancolitis
2. Colitis distal.

13. Actividad extraintestinal

1. Si.
2. No

14. En caso afirmativo:

1. Artropatía periférica.
2. Colangitis esclerosante primaria.
3. Sacroileítis.
4. Espondilitis anquilosante.
5. Úlceras orales
6. Eritema nodoso.
7. Uveítis.
8. Pioderma gangrenoso

15. Colectomía

1. Si
2. No

16. Motivo de la colectomía:

1. Sangrado
2. Megacolon
3. Perforación
4. Refractario a tx. médico
5. Displasia

6. Otro, especifique _____

17. Tipo de HLA: _____

Teléfono: _____

ANEXO 2

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MEDICAS Y NUTRICION "SALVADOR ZUBIRÁN".

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO MARCADORES INMUNOGENÉTICOS ASOCIADOS A LA SUSCEPTIBILIDAD DE DESARROLLAR COLITIS ULCEROSA CRÓNICA INESPECÍFICA (CUCI) EN PACIENTES MEXICANOS.

1. Estoy de enterado y de acuerdo a participar de manera voluntaria en un estudio clínico cuyo objetivo es estudiar el mecanismo por el cual se produce la CUCI e investigar si existen factores a nivel de los genes para el desarrollo de la enfermedad que usted padece, sólo consiste en la determinación de una muestra de sangre.
2. Para llevar a cabo el estudio es necesario tomar una muestra de sangre de aproximadamente 4ml con el objeto de extraer el DNA a partir de las células sanguíneas periféricas obtenidas.
3. Los resultados serán comunicados a la brevedad posible y serán totalmente confidenciales.
4. El material genético obtenido no será sometido a ningún tipo de manipulación. La información obtenida solamente será con fines de investigación.
5. Este tipo de estudio no conlleva ningún tipo de riesgo a su persona, sólo la molestia de la toma de una muestra sanguínea de una vena.
6. La decisión es voluntaria y mi no participación en el estudio no afectará en el tratamiento y atención clínica en el Instituto.
7. El costo del estudio genético no tendrá ningún costo.
8. El estudio se realizará en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán".

Nombre y firma del paciente.

Testigo.

Testigo.

ANEXO 3

CRITERIOS CLINICOS PARA LAS DIVERSAS ENFERMEDADES AUTOINMUNES

A. ARTRITIS REUMATOIDE

1. Rigidez matutina que dura al menos una hora antes de que se alcance la mejoría funcional máxima.
2. Artritis de tres o más áreas articulares con tumefacción de partes articulares o derrame articular.
3. Atritis de las articulaciones de la mano: artritis de la muñeca, articulación metacarpofalángica o interfalángica proximal.
4. Artritis simétrica.
5. Nódulos reumatoides.
6. Factor reumatoide positivo.
7. Alteraciones radiológicas: erosiones o descalcificación ósea.

B. LUPUS ERITEMATOSO GENERALIZADO

1. Eritema malar.
2. Eritema discoide.
3. Fotosensibilidad.
4. Ulceras orales.
5. Artritis no erosiva de 2 o más articulaciones periféricas.
6. Serositis (pleutitis o pericarditis).
7. Afección renal: Proteinuria mayor de 0.5 grs/dfa o +3 cilindros celulares.
8. Actividad neurológica: Convulsiones o psicosis..
9. Afección hematológica: Anemia hemolítica, leucopenia, linfopenia, trombocitopenia.
10. Trastornos inmunitarios (células LE, anticuerpos anti-DNA o anti-Sm o VDRL positivo.
11. Anticuerpos antinucleares.

C. ESCLERODERMA

1. Engrosamiento difuso de la piel.
2. Telangiectasias.
3. Areas de hiper o hipopigmentación.
4. Fenómeno de Raynaud.
5. Disfagia, fibrosis pulmonar o involucro cardíaco o renal.
6. Anticuerpos antinucleares positivos.

D. SINDROME DE SJÖGREN

1. Xeroftalmía.
2. Xerostomía.
3. Anticuerpos anti-Ro y anti-La.

E. PSORIASIS

1. Placas bien delimitadas, rojo brillante, escamas plateadas localizadas en rodillas, codos y piel cabelluda.
2. Onicolisis.
3. Prurito leve.

F. DIABETES MELLITUS TIPO I.

1. Glucemia ≥ 126 mg/dl.
2. Edad menor a 18 años.
3. Anticuerpos anti-islote, anti-GAD.

G. ENFERMEDAD TIROIDEA AUTOINMUNE

1. Datos clínicos compatibles con distiroidismo: Temblor, nerviosismo, insomnio o somnolencia, diarrea o constipación, piel seca o muy húmeda, taquicardia o bradicardia, mixedema, exoftalmos, etc.
2. Crecimiento y dolor de la glándula tiroidea.
3. Alteración en las pruebas de funcionamiento tiroideo.
4. Anticuerpos anti-microsomales y anti-tiroglobulina.

H. MIASTENIA GRAVIS

1. Debilidad muscular voluntaria.
2. Diplopia.
3. Ptosis.
4. Disfagia.
5. Anticuerpos anti-receptor de acetilcolina.
6. Estudios electrofisiológico compatible con alteración en la transmisión neuromuscular.

I. ESCLEROSIS MULTIPLE

1. Debilidad, diplopía, paraparesia espástica, neuritis retrobulbar, adormecimiento, desequilibrio.
2. Placas desmielinizantes múltiples del cerebro evidenciadas por resonancia magnética.
3. Incremento del contenido de proteínas y bandas oligoclonales (IgG) en líquido cefaloraquídeo.

J. HEPATOPATIA AUTOINMUNE

1. Astenia, adinamia, fatiga, malestar general.
2. Ictericia, coluria, acolia, prurito.
3. Hiperpigmentación.
4. Alteración de las pruebas de funcionamiento hepático.
5. Positividad a anticuerpos anti-músculo liso, anti-mitocondriales, anti-nucleares.

K. ANEMIA HEMOLITICA O PURPURA TROMBOCITOPENICA IDIOPATICA

1. Fatiga, palidez generalizada, petequias, sitios de sangrado.
2. Anemia (Hb <12grs/dl o trombocitopenia < 10,000)
3. Coombs positivo.
4. DHL elevada.

L. ENFERMEDAD DE CROHN.

1. Evacuaciones diarreicas con moco y sangre, pujo, tenesmo rectal, fistulas.
2. Afección de cualquier parte del tubo digestivo (desde la boca al ano).
3. Histopatología compatible con afección transmural del tubo digestivo.
4. Velocidad de sedimentación globular elevada.
5. Hallazgos endoscópicos característicos: úlceras profundas transversales y longitudinales, tumefacción nodular que da un aspecto de "empedrado", edema e hiperemia de la mucosa, pared fibrótica, rígida y estenótica.

ANEXO 4
EQUIPO, MATERIAL Y TÉCNICAS

EQUIPO:

- Campana de extracción.
- Termociclador.
- Lámpara de rayos ultravioleta.
- Incubadora para hibridación. Baño de agua.
- Fuente de vacío.
- Cámara fotográfica.

MATERIAL:

- Tubos Falcon de 50 ml estériles.
- Pipetas Pasteur.
- Micropipetas de 5, 20 y 100 ul.
- Tubos Ependorf de 2.5 ml.
- Bolsas de hibridación.
- Película de rayos X.
- Películas fotográficas.

REACTIVOS:

- Amortiguador salino de fosfatos.
- Solución de lisis AKC (NH_4Cl 0.155M + K_2CO_3 0.01 M).
- Solución RCB (NaCl 10mM + Tris-base 10mM + EDTA 25 mM).
- Amortiguador Tris-EDTA.
- Amortiguador de Tris-Base 0.5 M, pH=8.0.
- Solución de Duodecil sulfato de sodio (SDS) al 10%.
- Proteínasa K (10mg/ml).
- Fenol.
- Cloroformo.
- Alcohol etílico absoluto.
- Iniciadores derecho e izquierdo.
- Cloruro de Magnesio.
- Deoxinucleótidos (ATP, CTP, GTP, TTP).
- Taq polimerasa.
- Agarosa al 1%.
- Bromuro de etidio (10mg/ml).
- Solución de naranja G (10 ml de Ficoll al 20%, 2 grs de Tris-base y suficiente natanja G para dar color).
- Hidróxido de sodio NaOH 0.5M.
- Cloruro de sodio NaCl 1.5 M.
- Tris-base 0.5 M pH=7.4.

- Terminal transferasa.
- Cloruro de cobalto CoCl_2 25 mM.
- Oligonucleótidos (sondas) en concentración de 10 pmoles/ul.
- Digoxigenina (ddUTP-Dig) en concentración de 1 nmol/ul.
- EDTA 0.2 M pH=8.0.
- Glucógeno.
- Cloruro de litio LiCl 4M.
- Etanol al 70%.
- Membranas de Nylon.
- Solución de hibridación. SSPE 6X, solución Denhardt 5X, Lauril-sarconine de sodio 0.1%, SDS 0.02%.
- SSPE 30X: NaCl 4.5 M NaH_2PO_4 0.3M, EDTA 30 mM.
- Solución Denhardt: PVP y Ficoll 400 al 2%, 2grs de albúmina sérica bovina.
- Solución de cloruro de tetrametil amonio 5M (TMAC).
- Solución de revelado 1: Acido maleico 0.1M, NaCl 0.15M.
- Solución de revelado 2: Amortiguador 1 más 0.3% de Tween 20.
- Solución de revelado 3: Solución de bloqueo diluída 1:10 en amortiguador 1.
- Solución de revelado 4: Tris-base 0.1M pH= 9.5, NaCl 0.1M y MgCl_2 50mM.
- Solución de bloqueo: reactivo de bloqueo al 10% en amortiguador 1.
- Anticuerpo anti-digoxigenina acoplado a fosfatasa alcalina.
- Amortiguador de revelado 4: Tris 0.1M pH=9.5, NaCl 0.1M y MgCl_2 50mM.
- Dioxetano.

TECNICAS:

Extracción de DNA (62).

1. Colocar 3-4 ml de sangre (EDTA) en un tubo Falcon de 50 ml.
2. Agregar 30 ml de PBS y centrifugar a 2,000 rpm durante 10 minutos.
3. Tirar el sobrenadante y al paquete agregarle 50 ml de solución de lisis (AKC), incubar por 30 minutos e inmediatamente centrifugar a 1500 rpm durante 10 minutos.
4. Descartar el sobrenadante y colocar PBS, agitar y centrifugar a 1500 rpm durante 5 minutos.
5. Descartar el sobrenadante y agregar AKC, agitar y centrifugar a 1500 rpm durante minutos.
6. Descartar el sobrenadante y agregar PBS, agitar y centrifugar a 1500 rpm durante 5 minutos.
7. Descartar el sobrenadante y agregar 3 ml de amortiguador RCB, 30 ul de SDS al 10% y 100ul de proteinasa K (10mg/ml). Incubar la mezcla durante la noche en baño maría a 65-70° C.
8. Al siguiente día, saturar el fenol utilizando Tris base 0.5 M pH= 8.0 volumen a volumen.
9. Sacar los tubos del baño y agregar a cada uno 3 ml de fenol saturado, agitar y centrifugar a 1500 rpm durante 5 minutos.
10. Obtener la fase acuosa y a ésta agregarle nuevamente 3 ml de fenol saturado, agitar y centrifugar a 1500 rpm durante 5 minutos.

11. Separar la fase acuosa y agregarle 2 ml de amortiguador de Tris-EDTA y 5 ml de cloroformo, agitar y centrifugar como en el paso anterior.
12. Obtener la fase acuosa y agregarle otros 5 ml de cloroformo, agitar y centrifugar. Este paso se repite hasta la fase acuosa quede cristalina.
13. Separar la fase acuosa y agregar NaCl 5M (la décima parte del volumen final, de manera que el NaCl quede a 0.5M en la solución).
14. La mezcla anterior se agita y se agrega etanol absoluto en proporción 1:4 V/V.
15. El DNA precipitado se separa en un tubo ependorf de 2.5 ml. Este DNA se lava con etanol absoluto, el cual se desecha. El DNA se deja secar ya sea con N₂ o a temperatura ambiente.
16. Una vez seco, el DNA se hidrata ya sea con tris-EDTA o con agua destilada y se guarda a -20° C hasta su uso.

II. *Amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)* (63,64).

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

- Agua 1762.5 ul.
- Amortiguador de PCR 10X 250 ul.
- Deoxinucleótido 2mM 250 ul.
- Iniciador derecho 50 ul.
- Iniciador izquierdo 50 ul.
- Agitar bien y ponerla en hielo
- Taq polimerasa 12.5 ul.

Antes de añadir la enzima a la mezcla, colocar 2ul (0.5ug) de los DNA en los tubos de PCR. Por último, añadir 47.5 ul de la mezcla anterior a cada tubo (mezclando DNA y solución) y agregar 2 gotas de aceite mineral.

Posteriormente los tubos son colocados en el termociclador, el cual se programa con las siguientes condiciones que son estandarizadas en el laboratorio:

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

El proceso se realiza durante 30 ciclos.

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

Finalmente las muestras amplificadas son guardadas para realizar la hibridación. Los iniciadores que serán utilizados son aquéllos para la región genérica DRB1 sugeridos en el XI taller internacional de histocompatibilidad (65).

III. Marcaje de las sondas (66).

Cada sonda en cantidad de 95 picomoles es mezclada con 4 ul de amortiguador para la terminal transferasa, 4 ul de solución de CoCl 25 mM, 1 ul de ddUTP-Dig (1nmol/ul) y 1,5 unidades de terminal transferasa. La mezcla se incuba a 37° C durante 30 minutos y después se coloca en hielo. Por otra parte, se mezcla 1 ul de glucógeno con 200ul de EDTA 0.2M pH=8.0 y a esta solución se añaden 2 ul a la mezcla inicial. El oligonucleótido marcado se precipita con 2.5 ul de LiCl 4M y 85 ul de etanol absoluto pre-enfriado a -20° C, se mezcla bien y se mantiene a -70° C durante 15 minutos y después a 20 o C durante 2 horas o toda la noche. Centrifugar a 12000 rpm durante 20 minutos a 4° C, eliminar y lavar el paquete con 60 ul de etanol. Centrifugar a 12000 rpm durante 10 minutos a 4° C, eliminar el sobrenadante y secar el tubo al vacío.

IV. Hibridación (67)

Tratamiento de la membrana: La membrana de nylon es cortada en cuadros de 10cm². La membrana se humedece en agua destilada, posteriormente se coloca en una solución de SSPE 10X durante 15 minutos. Se seca en el horno a 60° C, en cada cuadro de 1cm² se colocan 2 ul del DNA amplificado.

La membrana se seca a temperatura ambiente y luego en el horno a 80° C (puede fijarse el DNA utilizando un transiluminador de luz ultravioleta). Una vez colocado el DNA en la membrana se procede a desnaturalizarlo, colocando la membrana en una solución de NaOH 0.5M/NaCl 1.5M durante 5 minutos. Después de la desnaturalización, la membrana es neutralizada colocándola en una solución de NaCl 1.5M/tris-base 0.5M pH=7.4 durante un minuto. Finalmente la membrana se hornea a 80° C durante 10 minutos y se pone en un transiluminador de luz ultravioleta durante 3 minutos.

Hibridación: Las membranas que contienen el DNA amplificado son pre-hibridadas en la solución correspondiente (0.1-0.2 ml/cm²) durante al menos 30 minutos a 42° C en baño maría y utilizando bolsas de plástico. Posteriormente las membranas son hibridadas en la solución para este efecto, la cual contiene el oligonucleótido marcado con digoxigenina (2 a 4 picomoles de sonda por cada ml de solución de hibridación). Esta solución también se agrega de 0.1 a 0.2 ml por cada cm² de membrana; este proceso se realiza a 42° C durante toda la noche. Las membranas son posteriormente lavadas en 2 ocasiones (5 minutos cada una) con una solución de SSPE 2X y SDS 0.1% a temperatura ambiente con agitación utilizando para esto recipientes de plástico de tamaño apropiado a la membrana. Por lo general se utilizan de 50 a 100 ml de solución de lavado por cada 100cm² de membrana.

Posteriormente la membrana se lava con una solución TMAC 3M durante 10 minutos a temperatura ambiente y finalmente se lava 2 veces con esta misma solución durante 15 minutos a 59° C.