

11261
Ej
7.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE MEDICINA

**POLIMORFISMO DEL FACTOR B EN DIABETICOS
DEPENDIENTES DE INSULINA**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOMEDICAS
(INMUNOLOGIA)**

**SUSTENTA
CLARA PATRICIA GOMEZ GOMEZ**

**ASESOR
DR. LUIS TERAN**

**INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS
S.S.A. UNIDAD DE INVESTIGACION**

MEXICO D. F., 1987

FALTA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.

CONTENIDO

Pág.

I.-	Resumen	
II.-	Introducción	
	1. Historia	1
	2. Diabetes dependiente de insulina como padecimiento autoinmune	5
	3. Los antígenos de histocompatibilidad y el control de la respuesta inmunologica.....	8
	4. El factor B del complemento	11
	5. Papel biológico	14
	6. Asociación HLA - Enfermedad	20
III.-	Objetivos	22
IV.	Material y métodos	23
V.	Resultados	34
VI.	Discusión	36
VII.	Bibliografía.....	40

ABSTRACT

FACTOR B POLIMORPHISMO IN INSULIN DEPENDENT DIABETES MELLITUS

We studied 68 patients with diabetes type I, classified according to National Diabetes Data Group criteria. The control group were 200 healthy subjects with a similar socioeconomic and ethnic background. This study has as main purpose to look for which polymorphisms of the HLA are associated with the diabetes. The electroimmunofixation was used for to study the polymorphism of factor B of Complement and the microcitotoxicity to study the classes I and II of HLA.

We observed in patients and increase of frequency of alele F1 of factor B (with a Relative Risk 15.54) in the other classes: the A2 (with a Relative Risk 4.19) the B8 (with a Relative Risk 9.4) and the DR3 (with a Relative Risk of 7.66).

We can see the strong association between the F1 of Factor B and diabetes measured by the Relative Risk (the biggest). This association seems to be universal, in basis of similar results obtained in other populations.

The study of the autoimmunes predisposition in the diabetes insulin dependent linked to HLA system is very important and we have to continue in the search of markers with diagnostic

or pronostic value and finally let us to intent a very early treatments with inmmunosupresors, actually the moré promising terapy compared with others (like transplant or the artificial pancreas).

RESUMEN

POLIMORFISMOS DEL FACTOR B EN LA DIABETES MELLITUS INSULINO DEPENDIENTES

Se estudiaron 68 pacientes con diabetes tipo I, clasificados de acuerdo a los criterios establecidos por el National Diabetes Data Group. El grupo control estuvo constituido por 200 sujetos sanos, similares en cuanto a condiciones socioeconómicas y étnicas.

Este estudio tuvo como principal propósito la búsqueda de polimorfismos del HLA asociados a la diabetes. La electroinmunofijación fue empleada para el estudio de los polimorfismos del factor B y la microcitotoxicidad para la determinación de los alelos de las clases I y II del HLA.

En los pacientes se observó un incremento en la frecuencia del alelo F1 del factor B (con un Riesgo Relativo de 15.54), en las otras clases de alelos A2 (con un Riesgo Relativo de 4.19), B8 (con un Riesgo Relativo de 9.4) y DR3 (con un Riesgo Relativo de 7.66).

Se puede apreciar la poderosa asociación entre el factor B, F1 y la diabetes, medida por el Riesgo Relativo (la mayor de todos los alelos del HLA).

Esta asociación pareciera ser universal, de acuerdo a resultados semejantes obtenidos en otras poblaciones.

El estudio de la predisposición a la autoinmunidad, en la diabetes dependiente de insulina asociada al HLA, se visualiza como muy importante. Pareciera conveniente, entonces, continuar la búsqueda de marcadores con valor diagnóstico o pronóstico, lo que finalmente nos permitirá intentar tratamientos muy tempranos con inmo supresores, todavía la terapia más prometedora comparada con otras (como el transplante o el páncreas artificial).

POLIMORFISMO DEL FACTOR B EN DIABETICOS DEPENDIENTES DE INSULINA

HISTORIA

No se sabe cuándo aparece la diabetes en el humano (1). Algunos la identifican en el papiro de Ebers (1500 A.C) en la descripción que pudiera corresponder con este padecimiento. La descripción de Celsus (30 A.C. -50 D.C.), no deja lugar a dudas; el nombre "DIABETES" fue dado por otro médico romano, Aretaus de Cappadocia (30-90 D.C.), significando para unos "paso a través de" y para otros "sifón", lo que nos indicó que la poliuris era lo más sobresaliente, atribuyéndose el padecimiento a una "debilidad renal" (1).

La presencia de una substancia parecida a la miel fue reconocida por chinos, japoneses e hindúes. El médico árabe Avicenna la describe hacia el año 1000 D.C., añadiéndole algunas complicaciones como gangrena, forunculosis (1). En Europa es "descubierta" por Thomas Willis hacia el siglo XII (1). Sin embargo, la presencia de azúcares en la orina pasó a ser desde una observación aislada a un signo de valor diagnóstico de la enfermedad. Cawley -en 1788- (1) aparentemente fue el primero en relacionar a la diabetes con alteraciones del páncreas, en la autopsia de un enfermo de diabetes. Antes de él, Brunner -en 1862- (1) observó polidipsia y poliuria después de extirpar el páncreas en animales de experimentación, pero no relacionó este hallazgo con la diabetes.

En 1796 Rollo (1) introduce las restricciones dietéticas como tratamiento: Tromer y Von Fehling (en 1841 y 1848, respectivamente) (1) desarrollaron la bien conocida prueba del óxido cúprico para azúcares urinarios.

En el siglo XIX resaltan las contribuciones hechas por Claude Bernard (1) en el conocimiento del metabolismo de carbohidratos, estableciendo -entre otras cosas- la presencia de glucógeno en el hígado. Propuso la teoría de la formación de azúcar a partir del glucógeno, interpretando -además- que la hiperglicemia del diabético era una consecuencia de una superproducción de azúcares por el hígado. A su vez, no le dio mucha importancia al páncreas, considerando a esta glándula exclusivamente de secreción externa. Y aunque no tenía modo de cuantificar el azúcar -ya que los procedimientos eran más que nada cualitativos-, relacionó la hiperglicemia con la glucosuria presente en la diabetes.

Pavy (1) fue el primer investigador que desarrolló un método cuantitativo para la glucosa, realizando determinaciones simultáneas en sangre y en orina y comprobando así la relación ya propuesta por Bernard. Al fin del siglo XIX destacan personalidades como Von Noorden y Falta (1) (que formaban parte de la "Escuela de Viena"), en tanto que Nawnyn -en Alemania- establece para la diabetes las siguientes características:

- a) La tendencia hereditaria del padecimiento

- b) Las diferencias importantes entre la diabetes de adulto y la juvenil; y además,
- c) introduce el término "acidosis diabética" que se debe a la "acumulación de cuerpos cetónicos".

El conocimiento de los desarreglos metabólicos trajo como consecuencia tratamientos médicos más racionales, y por tanto, más efectivos. Destacan en este campo Lépine y Guelpa -en Francia y Joslin y Woodyatt - en EUA- (1).

Pese a todos los estudios, el problema fundamental acerca de la etiología de la diabetes permanecía sin decifrar. En 1869, Paul Langerhans describió unos islotes -que ahora llevan su nombre- en el tejido pancreático, considerándolos parte del sistema linfoide. En 1889, Von Mering y Minkowski (1) mostraron que perros pancreatectomizados desarrollaban hiperglucemia y glucosuria, muriendo finalmente en cetosis y coma. Esta fue la primera prueba experimental del origen pancreático de la diabetes.

Los experimentos de Minkowski -quien transplantó pedazos de páncreas en perros pancreatectomizados debajo de la piel o en el abdomen, previniéndoles así la diabetes- y sus resultados dejan ver claramente que él interpretaba al páncreas cumpliendo una doble función; por un lado, crear fermentos digestivos;

y por otro, producir alguna substancia que influyera de alguna manera en el metabolismo del azúcar. Por su parte, Hédon hizo experimentos de trasplantes muy semejantes, involucrando también al páncreas con sus modelos de parabiosis, como el órgano clave en la enfermedad.

El refinamiento de las técnicas histológicas permitió a Weichselbaum y Stanle detectar cambios en los islotes de los enfermos.

Opie (1), a principios de este siglo, le adscribe a las células de los islotes la responsabilidad de la función endócrina del páncreas. Esto provocó una carrera científica para aislar el principio pancreático que regulaba la glicemia y en 1921 Banting (1) trabajando en el laboratorio de J.J.R. Macleod, en Toronto, pudo finalmente aislar esta secreción interna (a partir de la cual aisló, en años posteriores, a la insulina).

Los extractos obtenidos por Banting eran excelentes para curar a perros, pero fracasaron en humanos diabéticos en donde la hiperglicemia no se modificaba, provocando, además, reacciones locales intensas. La primera insulina cristalina fue preparada por Abel del John Hopkins, en 1926 (1). Scott y Fisher (1) encontraron que, agregándole zinc o protamina a la insulina se podía influir en su velocidad de absorción.

La cirugía experimental rindió grandes contribuciones a nuestro

conocimiento de la diabetes. El Dr. Bernardo A. Houssay (1), uno de los más destacados fisiólogos de nuestro siglo, estableció la hipersensibilidad que tenían ranas y perros hipofisectomizados a la administración de insulina.

Demostró que la hiperglicemia provocada en perros por la pancreatomec-tomía podía ser evitada si ahora se hacía una hipofisectomía. En 1937 Houssay (1) y sus colegas proporcionaron evidencia que el lóbulo anterior de la hipófisis era "diabetogénica", ya que extractos inyectados en animales pancreatomec-tomizados e hipofisec-tomizados agravaba su condición.

LA DIABETES DEPENDIENTE DE INSULINA COMO PADECIMIENTO AUTOINMUNE

Debido al descubrimiento y caracterización de los animales con diabetes mellitus espontanea se han obtenido datos valiosos para explicar la patogénesis de la diabetes mellitus tipo I (2) la rata Biobreeding hasta la fecha es la mejor análoga de la diabetes mellitus dependiente de insulina en humanos. Esta rata fue descubierta en 1974 en una colonia de ratas comerciales derivadas de la Wistar mantenidas en los laboratorios Biobree-ding de Ottawa, Canadá. La colonia original B.B. se estableció por la cruce de parientes normales y animales diabeticos.

El ratón diabético no obeso es obtenido de el raton CTS en Japón,

son propensos a cetosis. Desarrollan insulinitis a las 5 semanas de edad y a los 7 meses afecta el 80% de las hembras y 20% de machos. Los ratones diabéticos no obesos tienen reducido el número de linfocitos T células natural Killer y linfocitos citotóxicos. Han sido hallados anticuerpos a células de islotes en las dos primeras semanas de edad.

En base a estos estudios se ha establecido la importancia del MHC en la etiología de la DM1 tipo I en humanos, ratones y ratas, así como la importancia pronóstica (muy discutida) de la presencia de anticuerpos contra las células de islotes.

Al mismo tiempo, se han descubierto anomalías de células T, animales recién nacidos timectomizados reducen la frecuencia de diabetes (3) y se ha encontrado alteración en la actividad de T supresora cuando los linfocitos de humanos fueron estimulados ya sea con mitógenos (con A) o por antígenos pancreáticos (4)

Las evidencias sugieren pérdida progresiva de la secreción de insulina en la fase que antecede a la diabetes clínica.

El desarrollo de la diabetes tipo I puede -conceptualmente- ser dividido en 6 estados, empezando con una susceptibilidad genética y terminando con una completa destrucción de células beta. El primer estadio es la susceptibilidad genética, el segundo es un evento disparador que afecta a menos del 50% de los

sujetos susceptibles (estudios en homocigotos), el tercero es el desarrollo de autoinmunidad activa.

Inicialmente, los pacientes con anomalías inmunológicas tienen secreción de insulina normal. Durante el cuarto estadio, las anomalías inmunológicas persisten, pero la secreción de insulina estimulada por la glucosa disminuye progresivamente, a pesar de tener niveles normales de glucosa en la sangre. En el quinto estadio es el inicio de la diabetes clínica permaneciendo alguna secreción de insulina, y en el sexto una completa destrucción de células beta.

Debido a que es difícil obtener el tejido pancreático para su estudio, el estado de células beta es conocido solo en 3 estadios:

- a) Primer estadio (susceptibilidad genética), cuando las células de los islotes es normal;
- b) Estadio quinto (inicio de diabetes clínica); y
- c) Estadio sexto (destrucción completa de células beta).

Al inicio de la diabetes tipo I permanecen por lo menos 10% de células beta y muchos años después del desarrollo de la diabetes clínica todas las células betas son destruidas.

Los ratones diabéticos no-obesos. Las ratas Biobreeding (llamadas así por los laboratorios Biobreeding de Canadá, en donde

la cepa fue descubierta) y los humanos tienen, todos, cuando menos un gene en la región del MHC, que contribuye a la susceptibilidad de diabetes.

En suma, la herencia de la diabetes en las tres especies es multigénica e involucra a uno o más genes fuera del MHC como el grupo sanguíneo Kidd que se encuentra en el cromosoma 2 (5).

LOS ANTIGENOS DE HISTOCOMPATIBILIDAD Y EL CONTROL DE LA RESPUESTA INMUNOLOGICA

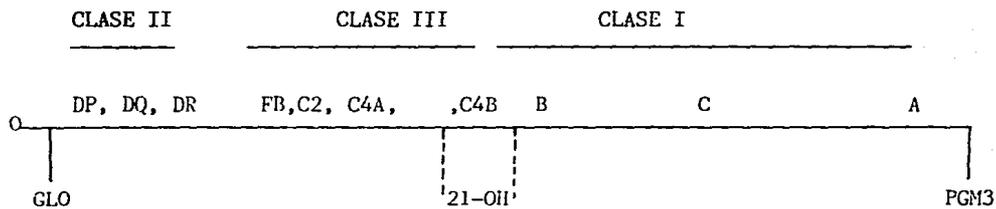
Los antígenos del MHC fueron estudiados inicialmente en el ratón por Gorer (6) (denominándolo sistema H2) en los años treinta y desde entonces se reconoció que había varios (cuando menos, 14 sistemas polimórficos proteicos) localizados en el cromosoma 17. El estudio de los sistemas equivalentes en el humano se inicia en los años cincuentas con Dausset, siguiendo siempre la pauta de lo conocido en los murinos (7).

En el humano, el MHC se encuentra localizado en el brazo corto del cromosoma 6. Existen 14 sistemas polimórficos proteicos, que son: A; C; B; C4A; BF; C2; D; DR; DQ y DP. Además, se encuentran marcadores enzimáticos tales como: Glioxalasa (GLOI); Fosfoglucomutasa 3 (PGM3); y la 21 Hidroxilasa (Fig. 1).

Por seguir la Primera Ley de Mendel, estos sistemas polimórfi-

FIGURA 1

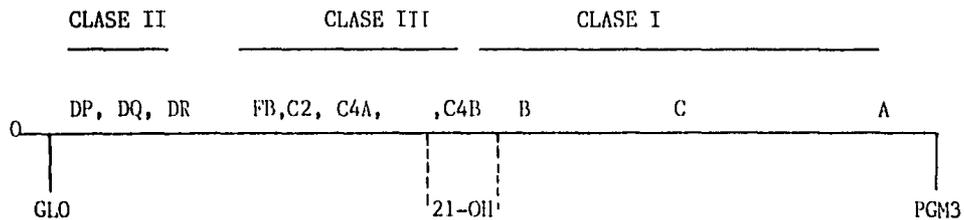
SISTEMA HLA



ENZIMAS INTERCALADAS EN EL HLA

FIGURA 1

SISTEMA HLA



ENZIMAS INTERCALADAS EN EL HLA

cos se heredan en forma codominante. Por lo tanto, tenemos doble dotación: uno, de origen materno, el otro, de origen paterno. De tal manera, poseemos 2 antígenos específicos (alelos) en cada locus. Cuando se tipifica a un individuo, es imposible saber cuales corresponden a cada uno de los 2 cromosomas 6, y, en esos casos, se hablará de un "fenótipo". Si simultáneamente se tipifica a los padres y hermanos de ese sujeto, se identifica a los alelos codificados en cada cromosoma. A éstos se les denomina: "haplotipos" (conjugación de haploide y genotipo). La definición de los dos haplotipos de un individuo constituye su "genotipo".

Clasificación

Klein (8) propone una clasificación basada tanto en las diferencias estructurales químicas como en la localización o expresión de las moléculas. De manera general, todos están compuestos por varios polipéptidos (9): los de clase I y II por dos cadenas; y los de la clase 3, como el C4 también. Las cadenas se denominan con letras griegas alfa y beta, de acuerdo a su tamaño (de mayor a menor, respectivamente). La cadena alfa de los antígenos de clase I y las cadenas alfa y beta de clase II se encuentran enclavadas en la membrana celular, reconociéndoseles 3 porciones: una intracelular o citoplásmica, otra intramembranal, y por último, la más grande, extracelular (extremo amino terminal),

presentando estructuras secundarias alternativamente de alfa y hélice y configuración beta. Las primeras (intracelulares), de 90 aminoácidos cada una, forman ovillo a veces perfectamente demarcados por puentes disulfuros, llamados "dominios". Estos últimos se marcan con la letra griega que corresponde a la cadena (alfa o beta) y con números arábigos, empezando por el extremo amino terminal.

Antígenos de clase III

En este grupo, encontramos a componentes del complemento (10).

A diferencia de las dos clases anteriores, estas proteínas no se encuentran integradas a las membranas celulares, sino en estado soluble en plasma. En el humano son el C2, el C4 y el factor B de la properdina (11, 12).

El C4, C3 y C5 están estructural y funcionalmente relacionados (13). Sin embargo, sus genes se han dispersado en todas las especies. El C4 cuenta con dos genes, el C4A y el C4B, separados entre sí por 10 Kb (donde se encuentra uno de los genes de la 21 hidroxilasa) y por cerca de 30 Kb del factor B y C2. Cada gene de C4 se asocia con un grupo sanguíneo: el C4A al Rodgers y el C4B al Chido. Estos grupos sanguíneos están estructuralmente relacionados al C4. Los alelos del C4A y el C4B se identifican por inmunofijación y se denominan con números arábigos.

El C2 y el factor B tienen un peso molecular semejante. Ambos con actividad enzimática de serina proteasa y sus genes están cercanos uno del otro, en el cromosoma 6; por tanto, se ha propuesto que es posible que tengan un gene ancestral común. Pero el que tenga un 35% de homología en su secuencia de aminoácidos denota que la duplicación génica ocurrió hace mucho tiempo. El C2 se tipifica mediante electroenfoque y se han identificado 3 alelos: el más frecuente en las poblaciones, denominado C (de común) y 2 raros que con el A de ácido y el B de básico, según su desplazamiento en el gradiente de pH. Por su lado, el factor B tiene, cuando menos 4 alelos, denominándose de acuerdo a su desplazamiento en electroforesis sobre gel de agarosa; así se hallan el S (slow; lento); el F (fast; rápido); y 2 variantes raras, que son el S1 (muy lenta) y la F1 (muy rápida).

EL FACTOR B DEL COMPLEMENTO

Síntesis

EL mecanismo de síntesis en el organismo de Bf ha sido estudiado por Alper, quien sostiene la hipótesis de que el hígado es el principal sitio de síntesis de Bf. En sus estudios se realizaron trasplantes hepáticos, determinándose los alotipos de los donadores y receptores antes y después del trasplante; el resultado

ha sido un cambio al tipo de donador, sin que se vuelva a encontrar rastros del alotipo original en los días posteriores al trasplante (14). Esta hipótesis también es sostenida por Hauptmann, quien ha realizado estudios de trasplante de hígado en humanos, llegando a la misma conclusión (15). También se ha encontrado que los macrófagos peritoneales de cobayos son capaces de sintetizar al Bf (16).

Balbwahs y Lachman han encontrado que las células provenientes del linfoma de Burkitt tienen la capacidad de sintetizar Bf; sin embargo, no han podido demostrar si el Bf está normalmente presente en la superficie de los linfocitos o si es secretado por ellos. Proponen la hipótesis de que el Bf está presente en la superficie celular en una forma accesible a los anticuerpos y que los sitios que reaccionan con el veneno de cobra están expuestos, mientras que el resto de la molécula se halla dentro de la membrana celular (17).

En otro estudio, realizado en mujeres parturientas, se demostró que el Bf no tiene la capacidad de atravesar la barrera placentaria, ya que los tipos Bf para la madre e hijo fueron diferentes en la mayoría de los casos, sin encontrarse una mezcla, de ellos. Además, se demostró que en la fase fetal hay síntesis de Bf, pues se encontró una concentración muy baja en el cordón umbilical, comparada con la concentración de la madre (18, 19).

Estructura

El factor B ha sido aislado y caracterizado como una glicoproteína con una movilidad electroforética Beta, rica en glicina (GBG) (20), con un contenido de 10.6% de carbohidratos. Se encuentra en el suero normal humano, en una concentración de 100-200 ug/ml; tiene una constante de sedimentación de 6.2 S y un peso molecular aproximado de 80.000 D (21).

Esta proteína se desnaturaliza a 50°C en 30 min. Cuando el suero se incuba con tripsina o a 37°C el factor B se fragmenta (22), dando origen a una glicoproteína de movilidad gamma, llamada glicoproteína gamma rica en glicina (GGG), la cual es 4.3 S; y a una glicoproteína con movilidad alfa, llamada Glicoproteína alfa, rica en glicina (GAG), de tamaño similar (22). Estudios recientes de la secuencia de aminoácidos del factor B han demostrado que el fragmento GAG procede de la fracción amino y que el fragmento GGG se deriva del carboxilo terminal (23). EL fragmento GAG tiene características ácidas y no participa en la reacción de activación del complemento, mientras que en el fragmento más básico (el GGG) está localizada la función de activación del C3 (24).

Los determinantes antigénicos de los dos fragmentos parecen ser distintos, ya que el anti-GGG produce reacción de identidad entre el GBG y GGG, pero no reacciona con el GAG. Por otro

lado, el anti- GBG produce reacciones con el GBG y con los dos fragmentos (18,25).

Polimorfismo

El polimorfismo del factor B fue inicialmente estudiado por Alper en 1972 (18).

Esta proteína ha demostrado tener cierto grado de polimorfismo cuando se la prueba en inmunofijación a pH 8.6 y aún en sueros de individuos homocigotos se detectan cuando menos 5 bandas (18). Dicho polimorfismo es determinado por dos genes comunes, el BfF (rápido) y el BfS (lento); y dos genes raros, el BfF1 y el BfS1 (26). Las frecuencias genéticas en 3 razas diferentes se muestran en el cuadro 1 (18, 26).

Debido a la presencia de los cuatro alelos, han sido observados los siguientes fenotipos: SS, FS, FF, F1F, F1S, FS1, SS1, S1S1, F1F1. Se ha sugerido que las variantes comunes BfF y BfS residen en el fragmento GAG y las variantes raras BfF1 y BfS1 están localizadas en el fragmento GGG (18).

PAPEL BIOLÓGICO

El complemento es un sistema multienzimático de amplificación, que cuenta con varias vías de activación, siendo las más conocidas la "clásica" y la "alterna" ambas en estrecha relación con

Cuadro 1

Frecuencias genéticas de el factor B en diferentes razas
(18,26)

(Raza)	S	F	F1	S1
Blancos	0.8055	0.1755	0.0095	0.0095
Orientales	0.890	0.110	-	-
Negros	0.437	0.512	0.051	

la respuesta inmune con diversas finalidades como: el hacer orificios en membranas celulares; atraer a células (quimiotaxis) durante la inflamación y promover la fagocitosis.

Alguna vez, nos hemos preguntado porqué al realizar un transplante algunos polimorfismos son tan eficientemente reconocidos al ser diferentes y provocan el fenómeno de rechazo. La respuesta la encontramos en el importante papel que juegan estas moléculas en las interacciones celulares que se llevan a cabo durante la respuesta inmunológica.

Un antecedente importante sobre el control genético de la respuesta inmunológica fue el descubrimiento en 1962 de Benacerraf (27) del control genético de la respuesta inmunológica; es decir, que la capacidad a responder celularmente a diferentes haptenos es una capacidad hereditaria. Esto lo sugirió en cobayos (animales de los que existían pocas líneas establecidas) con su sistema de histocompatibilidad poco estudiado. Posteriormente, McDevitt (28) -empleando más cepas de ratones cuyo sistema H2 estaba perfectamente definido- no solo comprobó el hallazgo ya descrito, sino que logró relacionarlo al MHC y descubrió un grupo de genes denominado desde entonces Ir (de la respuesta inmunológica) y que en el humano corresponden a los antígenos de clase II (loci DP, DQ y DR). Por lo tanto, los antígenos de histocompatibilidad eran aparentemente "determinantes" del control gené-

tico de la respuesta inmunológica.

En 1975 ocurren tres descubrimientos sobresalientes, los que se mencionarán aquí según su cronología histórica:

- 1) Erb y Feldman (29) demuestran que los antígenos de la clase II participan en el fenómeno de presentación del antígeno por parte de los macrófagos, a los linfocitos T cooperadores.
- 2) Katz, Dorf y Benacerraf (30) encuentran que este mismo grupo de antígenos es indispensable en la activación de los linfocitos B, por medio de los T cooperadores; y
- 3) Zinkernagel (31) demuestra que las células T citotóxicas presensibilizadas a un virus, deben reconocer a los antígenos virales en la superficie de la célula blanco y a los marcadores de identidad antígenos de clase I, para que se lleve a cabo la citólisis.

Por consiguiente, hasta este momento tenemos: a) el control genético de la respuesta inmunológica está restringido a los antígenos de clase II; y b) estas mismas proteínas son necesarias, tanto en la presentación de antígenos por parte de los macrófagos a los linfocitos T cooperadores, como de estas células en la activación de los linfocitos B. ¿Cómo ocurre esta regulación y por qué es necesaria la concurrencia tanto de molé-

culas de clase II como de antígenos? Hipotetizando acerca de los mecanismos que nos expliquen estos dos hechos, nos referimos -comparativamente- a lo conocido de las inmunoglobulinas.

Las inmunoglobulinas son moléculas constituidas por varias cadenas polipeptídicas, que presentan dominios bien definidos. Algunos de éstos muestran variabilidad en su secuencia de aminoácido, el cual está relacionado con la especificidad de reconocimiento. Otros dominios, a su vez, son constantes y están involucrados en funciones biológicas bien establecidas (como el paso placentario; activación del complemento; citofilia específica; etc.). Por su parte, los antígenos de histocompatibilidad de clase II, por estar constituidos de dos cadenas y éstas con dominios -algunos de los cuales son variables (polimórficos) y otros constantes- los suponemos que pueden dar una interpretación semejante (32). Así, los dominios constantes estarían involucrados en la activación célula a célula y los variables en su capacidad para reaccionar específicamente frente a determinantes antigénicos, formando un complejo; moléculas clase II- **antígeno**. De esta manera, la capacidad congénita para reconocer algunas estructuras dependerá del repertorio de las pequeñas secuencias de aminoácidos contenidas en las porciones polimórficas de estas moléculas.

De lo anterior, se comprende las ventajas que representa el

gran polimorfismo exhibido por este sistema. En este mismo contexto se aclara el por qué los homocigotos -es decir, heredar de ambos progenitores el mismo marcador- resultan en una limitación importante para un aparato incompetente. Y finalmente, el que al estar sometidas estas variaciones a presiones selectivas existan predominio de algunos alelos en poblaciones aisladas, constituyéndo así los rasgos característicos de las diferentes razas.

Para el cálculo de la frecuencia genética se recurre a la siguiente fórmula, derivada del equilibrio de Hardy-Weinberg (32).

$$\text{Frecuencia genética} = 1 - \sqrt{1 - \text{Frecuencia fenotípica}}$$

En el cuadro 2 aparecen algunas frecuencias en diferentes razas, las que por mantenerse invariables se dice que están en "equilibrio".

Tomando en cuenta la relación de los antígenos con el control genético de la respuesta inmunológica y de las presiones selectivas, resulta fácil comprender por qué, cuando se estudian las poblaciones de individuos con algún padecimiento en donde la respuesta inmunológica participa de alguna manera en la etiología, presentan estas frecuencias determinadas en algunos alelos o combinaciones de ellos que son estadísticamente diferentes al compararse con los individuos sanos de este mismo grupo étnico;

CUADRO 2 .- ENFERMEDADES ASOCIADAS AL HLA

ENFERMEDAD	HLA	FRECUENCIA		R.R.
		E	C	
Enfermedad de Hodgkins	A1	40	32	1.4
Hemocromatosis idiopática	A3	76	28	8.2
Enfermedad de Behcet	B5	41	10	6.3
Hiperplasia suprarrenal congénita	B47	9	0.6	15.4
Espondilitis anquilosante	B27	90	9	87.4
Enfermedad de Reiter	B27	79	9	37.0
Uveítis anterior aguda	B27	52	9	10.4
Tiroiditis subaguda	B35	70	15	13.7
Psoriasis vulgar	C6	87	33	13.3
Dermatitis herpetiforme	DR3	85	26	15.4
Enfermedad celiaca	DR3	79	26	10.8
Síndrome de Sjögren	DR3	78	26	9.7
Enfermedad de Addison	DR3	69	26	6.3
Enfermedad de Graves	DR3	57	26	3.7
Diabetes mellitus tipo I	DR3	56	26	3.3
Lupus eritematosos diseminado	DR3	70	28	5.8
Esclerosis múltiple	DR2	59	26	4.1
Síndrome de Goodpasture	DR2	88	32	15.9
Artritis reumatoide	DR4	50	19	4.2
Tiroiditis de Hashimoto	DR5	19	7	3.2

E = Enfermos
 C = Controles sanos
 R.R = Riesgo relativo

es decir, aparecen "desequilibrios"

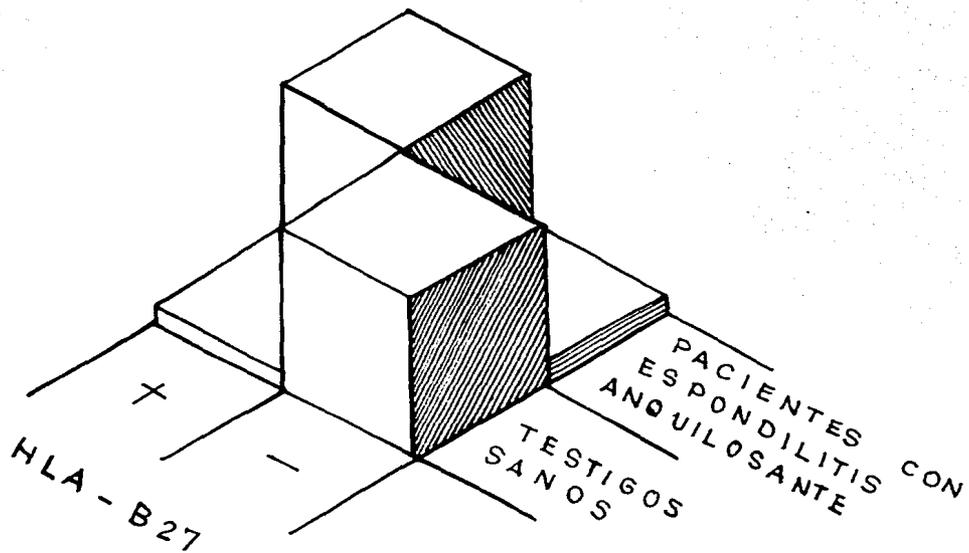
Desde las primeras evidencias de asociación entre el MHC y la susceptibilidad a la leucemia murina (investigación llevada a cabo por Lilly, en 1964) (33), se han realizado gran cantidad de trabajos en humanos en esta misma dirección, dando lugar -inclusive- a una subespecialidad dentro del campo denominado "inmunogenético".

En el cuadro 2 aparecen algunos ejemplos de la predisposición genética a padecer alguna enfermedad (34). De estas, se destaca la asociación existente entre el B27 y la espondilitis anquilosante, ya que el marcador genético en la población sana se encuentra en frecuencia de alrededor del 8%, mientras que en los enfermos llega hasta un 90% (ver figura 2).

Existen dos categorías para realizar estos estudios: una, en población abierta; la otra, en familias completas (35). Para la primera categoría, se selecciona un número representativo de enfermos cuidadosamente diagnosticado y se comparan con las frecuencias de alelos obtenidos con una población sana igualda en edad, sexo, lugar de origen, condiciones ambientales, razas, etc. Los resultados se analizan a partir de una tabla de contingencias 2 x 2.

Posteriormente se aplica la "chi" cuadrada (modificación de

FIGURA 2



Yates); o la prueba exacta de Fisher, tiene como limitante el no conocer las combinaciones de alelos por cromosoma y sólo inferirlas probabilísticamente. Tiene como ventajas por un lado, la facilidad de realización y por el otro, que los marcadores, que resulten tienen significado en la población estudiada. La otra estrategia es el estudio en familias completas, en donde el grupo testigo lo constituyen los familiares sanos. En este caso la comparabilidad de las poblaciones es mejor, dado que comparten en gran medida el fondo étnico ambiental y genético, por otro lado, se conocen las combinaciones de los alelos, lo que permite estudios muy finos de predisposición genética asociada a marcadores; ésto al mismo tiempo tiene una desventaja pues los resultados frecuentemente no tienen validez universal más que la familia en estudio.

ASOCIACION HLA - ENFERMEDAD

Para esto es importante tener en cuenta el descubrimiento de Benacerraf del Control genético de la respuesta inmunológica y que posteriormente McDenitt relacionó con los genes I en el ratón, región D en el humano y que consiste brevemente en: La capacidad hereditaria de responder o no, ante antígenos con estructuras químicas determinadas ejercido por el repertorio de sitios activos (capaces de unirse con los antígenos) contenidos en las regiones variables de las cadenas β de los antígenos clase II de

HLA.

Esto dio lugar a explorar la posible relación entre los antígenos de histocompatibilidad y la susceptibilidad hereditaria a padecer enfermedad con etiología inmune, cuadro 2.

Una vez afirmada esta hipótesis no sólo se ha explorado la asociación con un antígeno sino con combinaciones (haplotipos). La combinación y su relación con la localización -distancia- entre genes en un cromosoma y considerar a la combinación como un mecanismo de variación (evolución) y la falta de este fenómeno como desventaja.

Hipótesis que explica la asociación, cuadro 3.

Nos concretamos a la tipo II analizando los datos que hay informados mundialmente, cuadro 4.

Por los riesgos relativos y la variabilidad de alelos según la raza se puede deducir que el antígeno por sí sólo no es el factor determinante sino algún gene cercano y que por esa razón ha caído en desequilibrio de asociación, indicando que la localización de dicho gene de predisposición está muy cercano al gene DR y al factor B.

El FB y el DR3 y su combinación en el A1, B8, Dr3, SC01, se ha asociado a múltiples enfermedades autoinmunes, cuadro 5. Porque está aparentemente en desventaja selectiva no ha desaparecido -fuerzas selectivas-, cuadro 6.

CUADRO 3 .- CLASIFICACION DE LOS MECANISMOS DE ASOCIACION HLA ENFERMEDAD

CLASES	MECANISMOS	POBLACIONES	EJEMPLO
I	Antígeno directamente	Universal	B27 Espondi litis anqui losante
II	Inmunorregulación otros genes de regu- lación intercalados en el HLA	Dependiendo de la raza	Diabetes
III	Otros genes vecinos que por distancia caen en desequilibrio	Dependiendo de la raza	21 hidroxila- lase

CUADRO 4.- ASOCIACIONES A DIFERENTES CLASES DE ANTIGENOS DE
HISTOCOMPATIBILIDAD DE DIABETICOS DEPENDIENTES DE INSULINA EN
EN DIFERENTES PAISES

FACTOR B	PAIS	R.R.
S1	India	6.35
F1	Canadá	5.92-5.49
F1	Australia	7.51
F1	Francia	5.30-10.71
F1	Alemania Occidental	3.04
F1	España	6.41
LOCUS A		
A9	China	4.02
LOCUS B		
B5	China	0.99
B5	Japón	0.12-0.99
B7	U.S.A. Negros	0.78-1.57
B7	África	1.95
B7	Zulu	1.60
B7	México	1.17
B7	Canadá	0.10-0.55
B7	Australia	0.74
B7	Inglaterra	0.30-0.41
B7	Francia	0.32-0.87
B7	Alemania Occidental	0.41-0.44
B7	Italia	0.69
B7	Suiza	0.54
B7	Irlanda	0.55
B7	Finlandia	0.23-0.40
B8	U.S.A Negros	0.93-3.97
B8	Zulu	2.67
B8	India	1.84
B8	Sud Africa - India	2.69
B8	México	2.40-2.56
B8	Canadá	0.44-1.45
B8	U.S.A	0.82-5.93
B8	Australia	2.92
B8	U.R.S	3.22
B8	Inglaterra	2.13-3.30
B8	Francia	1.58-2.71
B8	Alemania Occidental	1.62-3.63
B8	Italia	2.02-2.64

B8	Austria	2.18-3.58
B8	Suiza	2.84
B8	Irlanda	1.58
B8	Finlandia	2.46-4.71
B14	U.S.A. Negros	0.17
B14	Zulu	3.53
B15	U.S.A. Negros	1.32-11.03
B15	Zulu	0.45
B15	India	1.02
B15	Sud Africa - India	1.08
B15	México	1.03-2.48
B15	Canada	1.59-2.62
B15	U.S.S.	0.90-3.24
B15	Australia	2.72
B15	Hungria	2.67
B15	URS	0.80
B15	Inglaterra	0.93-2.89
B15	Francia	0.42-2.33
B15	Alemania Occidental	1.91-3.04
B15	Italia	0.54
B15	Austria	2.64-2.72
B15	Irlanda	4.06
B15	Finlandia	2.36-3.81
B18	U.S.A. Negros	1.98
B18	India	0.20
B18	Sud Africa - India	1.08
B18	México	2.77
B18	Canada	0.85
B18	U.S.A.	0.70-10.97
B18	Norway	3.15
B18	Hungria	0.91
B18	URS	2.88
B18	Inglaterra	1.35-2.56
B18	Francia	2.44-8.14
B18	Alemania Occidental	1.82
B18	Italia	1.70
B18	España	3.36
B18	Austria	0.98
B18	Suiza	1.96
B18	Irlanda	1.43
B18	Finlandia	1.30-1.49
BW21	India	11.98
BW21	Sud Africa - India	3.01
BW22	Japón	0.88

BW35	U.S.A. Negros	0.68-0.97
BW35	Sud Africa	5.97
BW42	U.S.A Negros	0.48
BW42	Zulu	0.28
BW42	Sud Africa	0.10
BW52	Japón	0.11
BW54	Taiwan - Chinos	0.67
BW54	China	3.15
BW54	Japón	5.08-6.85
DR2	U.S.A Negros	0.01-0.08
DR2	México	0.03
DR2	Canadá	0.08-0.37
DR2	U.S.S.	0.03-0.29
DR2	Inglaterra	0.12
DR2	Francia	0.37
DR2	Austria	0.42
DR2	Suiza	0.28
DR3	U.S.A. Negros	2.06-6.05
DR3	Taiwan - Chinos	5.50
DR3	China	7.88
DR3	Japón	3.35-3.37
DR3	México	2.26
DR3	Canadá	1.16-2.82
DR3	U.S.A	2.35-6.58
DR3	Australia	3.20
DR3	Inglaterra	5.12
DR3	Francia	3.96-28.39
DR3	Austria	4.44-4.81
DR3	Suiza	8.65
DR4	U.S.A Negros	4.81-8.93
DR4	Taiwan-China	1.48
DR4	China	2.01
DR4	Japón	2.545-6.34
DR4	México	1.76-2.88
DR4	Canadá	1.47
DR4	U.S.A	3.01-5.93
DR4	Australia	1.48
DR4	Inglaterra	6.75
DR4	Francia	3.09-5.74
DR4	Austria	2.45-8.26

CUADRO 5

ENFERMEDADES ASOCIADAS AL HAPLOTIPO

A1, B8, DR3, SC01

LUPUS ERITEMATOSO DISEMINADO

DIABETES MELLITUS TIPO I

SINDROME DE SJÖGREN

ENFERMEDAD DE ADDISON

ENFERMEDAD DE GRAVES

ARTRITIS REUMATOIDE

CUADRO 6

FUERZAS SELECTIVAS PARA ESTE HAPLOTIPO

A1, BB, DR3, SC01

Excelente respuesta ante
infecciones

Predisposición a la
autoinmunidad

PREGUNTAS

- 1.- ¿La diabetes dependiente de insulina en el mestizo mexicano; se asocia al HLA clase III
- 2.- ¿A qué marcador o marcadores?
- 3.- ¿A qué combinaciones de ellos: (haplotipos)?
- 4.- ¿Con qué fuerza? y ¿tiene relación de clase?

HIPOTESIS

La diabetes dependiente de insulina en el mestizo mexicano como en el caucásico, también tiene etiología autoinmune, con un componente hereditario, multigénico y localizado en el brazo corto del cromosoma 6, cayendo en desequilibrio con uno o varios alelos de ese sistema.

OBJETIVOS

- 1.- Determinar a qué alelos de la Clase III del HLA se asocia la diabetes melitus dependiente de insulina en el mestizo mexicano.
- 2.- En qué combinación (haplotipos)
- 3.- Con qué fuerza de asociación

MATERIAL Y METODOS

Criterios de inclusión de los pacientes

Diabetes melitus tipo I: con polidipsia, polifagia y poliuria, etc.

Dependientes de insulina

De acuerdo a los criterios de la National Diabetes Data Group del National Institute of Health (36).

La dependencia a insulina se establece por la tendencia a desarrollar cetoacidosis o la falta de esta hormona.

Criterios de exclusión:

- Pancreatitis, otras enfermedades endocrinas genéticas;
- quemaduras severas, infartos del miocardio;
- anticuerpos en contra de insulina;
- diabetes lipoatrófica.

PACIENTES

Se estudiaron 68 pacientes con diabetes melitus tipo I; a 43 de ellos se les determinó HLA y factor B y al resto, 25 pacientes, sólo factor B.

De los 68 pacientes, 46 fueron enviados por el Dr. Mendoza Mor-

fin y 22 pacientes por la Dra. Clara Gonrodezky. El factor B fue procesado por nosotros, como así mismo el HLA de 29 pacientes. Los restantes, en el laboratorio de inmunogenética del ISET, S.S.A.

De los 43 pacientes a los que se les estudió HLA y factor B, 21 son hombres y 22 son mujeres. La edad de los pacientes va desde los 3 hasta los 19 años y la fecha de inicio, desde los 2 a los 12 años.

Se tomaron 200 testigos de población mestiza mexicana sana. La composición genética de este grupo es el resultado de la mezcla: caucásicos, españoles del siglo XVI; e indios mexicanos, con promedio de edad de 28.4 años y con porcentajes de 60% mujeres y 40% hombres (37).

DETERMINACION DEL FACTOR B

Se tomaron 4 ml de sangre anticoagulada con EDTA (en tubo vacota_{ner}). Se centrifugó y separó al plasma (guardado en alícuotas de 0.5 ml a 80°C hasta su uso.

El factor se identificó mediante la técnica de electroinmunofijación (38), que consiste en colocar 15 ó 20 microlitros de plasma o suero en un gel de agarosa al 1% con un milímetro de espesor. Enseguida se corre la electroforesis a 300 volts, durante 3 horas utilizando un amortiguador de Barbital a pH 8.6 y con una fuerza

iónica de 0.05 M. Al término de esta electroforesis se añade el anticuerpo específico al factor B por dos horas. Una vez precipitada la proteína en estudio, las proteínas no fijadas son lavadas en solución salina. Los complejos antígeno anticuerpo resultantes fijados en el gel son teñidos con azul coomassie después se mide la distancia de migración de las bandas respecto al sitio donde se colocó la muestra y se compra con los controles. Estos controles provienen de personas del laboratorio que han sido tipificadas por el Dr. Chester Alper en el Center For Research en Boston, Mass.

Agarosa: de Sigma de endosmosis media

Amortiguador de barbital

barbiturato de sodio	8.76 g
ácido barbitúrico	1.375 g
lactato de calcio	0.575 g

para un litro de agua y se ajusta el pH a 8.6

Azul comassie

Azul comasie	5 g
Metanol	900 ml
Agua destilada	900 ml
ácido acético glacial	200 ml

Solución decolorante

Metanol	750 ml
agua destilada	750 ml
ácido acético glacial	150 ml

El aplicador consiste de un aplicador de acetato de 20 por - 3 1/2 cm. Este tiene una parte hidrófoba y otra hidrofílica; la orientada en el gel quedando la hidrófoba donde se aplica la muestra.

Preparación del agar:

Se toman 2 partes de amortiguador

1 parte de agua destilada

y una cantidad de agarosa determinada para llevarlo a una concentración del 1%.

En dos placas de vidrio de 20 por 11 cm en donde en medio va un separador de 1 mm de espesor, colocó unas pinzas alrededor de la placa para sostener los vidrios, después vacio el agar caliente. Se dejó gelificar quedando listo para su uso.

TIPIFICACION DE LINFOCITOS

La purificación de linfocitos periféricos a partir de sangre desfibrinada, se efectuó por centrifugación sobre gradiente de densidad de Ficoll hypaque (39, 40), la separación de los linfo-

cidos T y B, fue por medio de la columna de nylon (39,40).

a) PURIFICACION DE LINFOCITOS

- 1.- Se extrae por punción venosa 30 ml de sangre, se desfibrina con perlas de vidrio
- 2.- Se diluye la sangre con un volumen igual de solución de Hank
- 3.- En tubos de ensaye se ponen 5 ml de la sangre diluída, se introduce hasta el fondo una pipeta Pasteur a través de la cual se depositan 3 ml de la solución separadora de Ficoll hypaque, evitando se mezclen.
- 4.- Se centrifuga a 1500 rpm por 30 minutos a temperatura ambiente
- 5.- Se recupera con la ayuda de una pipeta Pasteur, la banda de linfocitos que se localiza cerca de la interfase del suero y la solución separadora y ponerlos en tubos de ensaye.
- 6.- Se lavan los linfocitos con Hank, centrifugando a 100 rpm por 10 minutos. Se repite esta operación 2 veces más.
- 7.- Se verifica en la cámara que no hayan plaquetas.
- 8.- Las células se cuentan y se ajustan a 2×10^6 /ml en medio RPMI.

b) SEPARACION DE LINFOCITOS T Y B

- 1.- Los linfocitos purificados se resuspenden en 0.5 ml de medio

de cultivo y se pasan con una pipeta Pasteur por una columna de plástico de 0.8 x 10 cm., conteniendo aproximadamente 70-90 mg de nylon previamente impregnado en medio de cultivo con 5% de suero fetal de ternera y preincubado a 37°C por 30 minutos, el volumen de los linfocitos a separar no debe ser mayor.

2.- Se coloca la columna horizontalmente añadiendo 0.2 ml de medio de cultivo por el extremo abierto, a manera de sello para evitar que se alcalinice la suspensión de linfocitos.

3.- Se incuba la columna a 37°C por 30 minutos

4.- Se coloca la columna verticalmente sobre un tubo de ensaye se lava con 15 ml de medio de cultivo, excluyéndose los linfocitos T, se repite este lavado 2 veces más, recuperando los eluados en tubos separados.

5.- Se adicionan 5 ml de medio, pero ahora comprimiendo vigorosamente la columna a fin de desprender los linfocitos B.

6.- Se centrifuga el primer tubo de células T en un ml de medio de cultivo.

7.- Se decantan y resuspenden los linfocitos B en 0.5 ml de la solución de yodoacetamida e incubarlos en ella 30 minutos a temperatura ambiente, con el objeto de evitar que los monocitos den falsos positivos en la tipificación.

9.- Se ajusta la concentración de ambas poblaciones para tener aproximadamente 4×10^6 linfocitos por ml.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Microcitotóxicidad

1.- Una vez ajustada la concentración de cada una de las poblaciones de linfocitos a 4×10^6 cel/ml, se siembra 1 microlitro en cada pozo de la placa correspondiente, que previamente fue llenado con los antisueros correspondientes.

En las cajas con antisueros específicos para los productos de los loci A, B y C se colocan las muestras de linfocitos T y en las cajas con antisueros para el locus DR se colocan los linfocitos B.

2.- Se mezcla el contenido de los pozos utilizando un agitador vórtex.

3.- Se incuba 30 minutos a temperatura ambiente los linfocitos T y para los linfocitos B su tiempo es de 60 minutos, en las mismas condiciones.

4.- Se adicionan 5 microlitros de complemento de conejo diluido en cada pozo.

5.- Se incuba la placa que contiene a los linfocitos T durante 30 minutos a temperatura ambiente. Y la que contiene a los linfocitos B se deja reposar a temperatura ambiente 2 horas.

6.- Se coloca 5 ml en cada pozo de solución de eosina al 5% (3g en 100 ml de agua destilada pH 7)

7.- Se agita y se deja reposar durante 5 minutos

8.- Se agregan 5 microlitros de formalina neutralizada pH 7

9.- Se lee en un microscopio invertido a 250 aumentos se calcula el número de células vivas y muertas, las cuales se leen bajo contraste de fase. Los linfocitos vivos son refringentes y pequeños y los muertos son opacos y oscuros.

ANALISIS ESTADISTICO:

El análisis estadístico que se emplea en este trabajo fue el siguiente:

1.- Frecuencia antigénica o fenotípica (F.F): número de positivos o un antígeno, entre el número de sujetos estudiados.

2.- Frecuencia genotípica: $FG = 1 - \sqrt{1 - FF}$

3.- Cálculo de riesgo relativo (RR): se define el RR como la posibilidad de desarrollar una enfermedad cuando un antígeno está presente en comparación con el que habría si el antígeno no estuviera. Un riesgo superior a 1 indica que el antígeno es más frecuente en los pacientes que en los controles, mientras que un RR menor de uno indica asociación negativa (41). El método de Ryder y Svejgaard de cálculo de RR se basa en el procedimiento original de woodf (42), modificado por Haldane.

Mediante una tabla de contingencia de 2 x 2, se calcula tanto el RR como la χ^2 de una muestra de pacientes, a fin de comparar sus frecuencias antigénicas (HLA) con la población normal.

Tabla de contingencia de 2 x 2

Antígeno HLA

		+	-	Totales
Enfer- medad	Positivo	a	b	M3
	Negativo	c	d	M4
	Totales	M	M	

en donde a = pacientes con el Ag en cuestión
 b = pacientes sin el Ag
 c = controles con el Ag
 d = controles sin el Ag

El riesgo relativo es (41):

4.- cálculo de χ^2

Los resultados obtenidos en este estudio se colocan en la tabla de contingencia y χ^2 se calcula como sigue (43, 44)

$$\chi^2 = \frac{[(ad-bc) - n/2]^2 \cdot n}{M1. M2. M3. M4}$$

Cuando la χ^2 es mayor 3.68 el significado de la χ^2 se expresa en términos de p (probabilidad), los criterios considerados son los siguientes:

0.05 < P < 0.01 significativo

0.01 < P < 0.001 muy significativo

P < 0.0001 altamente significativo.

Mientras menor sea el valor de P (χ^2 más grande) mayor es el significado de asociación. El nivel de significancia es complicado en estos estudios por el número tan grande de frecuencias antigénicas que generalmente se comparan con el número de pacientes y el de controles. Usualmente 20 a 40 alelos son comparados, los casos de diferencias con una P < 5%. Por error de muestreo (de tipo 1 o error alfa) por tanto para evitar este tipo de accidentes es conveniente multiplicar los valores de

P por el número de alelos estudiados lo cual recibe el nombre de P corregida.

RESULTADOS

En la población mestiza mexicana, el alelo más común es el S, en tanto que el F1 es muy raro. Sin embargo, este último es muy alto en pacientes con diabetes melitus tipo I, ver cuadro 7.

Según se aprecia en el cuadro 8, en los 68 pacientes que se tipificaron con el factor B se halló una fuerte asociación con el F1 (una P menor 0.005).

De 43 pacientes en donde se compararon los antígenos de clase I, II y III, se encontró que el B8, DR3 y F1 del factor B, son los más asociados a este padecimiento, ver cuadro 9.

En el cuadro 10 se comparan estas combinaciones vemos a) el F1 es el que más se asocia con el DR3; b) el S, que no es significativo aislado en combinación sí se ve aumentado; y en c) vemos que el haplotipo clásico, asociado a la diabetes en población caucásica, también se ve elevado en la población mestiza mexicana.

Por otra parte, en estos 43 pacientes se puede constatar que el **sexo no tiene** una relación significativa, ver cuadro 11.

En la fig. 3, encontramos que en las 3 familias allí incluidas hay personas con F1, sin estar necesariamente enfermos y aunque esto no sea estadísticamente significativo tal vez se deba al número relativamente escaso de pacientes. Por último, se observa

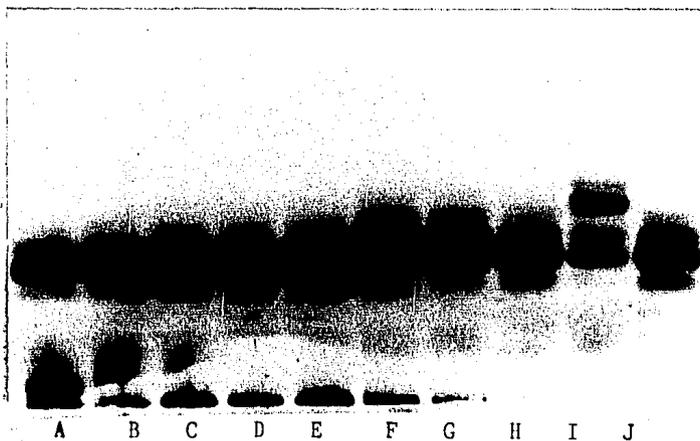
allí una tendencia a iniciar la enfermedad entre los 6-11 años, ver figura 4.

CUADRO 7.- FRECUENCIA DE LOS DIFERENTES ALELOS DEL FACTOR B

Alelo	Pacientes	Controles
	N = 68 (136 cromosomas)	N = 100 (200 cromosomas)
S	100	158
F	17	40
F1	19	2
S1	0	0

CUADRO 8 ANALISIS ESTADISTICO DEL FB DEL COMPLEMENTO

LOCUS	ALELO	Pacientes	Controles	X ²	P
		N = 68 FF	N = 100 FF		
FB	S	0.735	0.79	1.0695	0.3010
FB	F	0.125	0.20	1.72	0.0990
FB	F1	0.134	0.01	21.082	4,399 x 10 ⁻⁶



A B C D F → Son S,F; E es SS; G, H, I son S, F1, J → FF

CUADRO 9.- ALELOS DE LOS DIFERENTES LOCI DEL HLA DESEQUILIBRADOS EN DIABETICOS
DEPENDIENTES DE INSULINA

Locus	Alelo	Pacientes		Testigos		P	P _c	Rasgo Relativo
		N=43	N=295	FG	FG			
A	A2	51.2	20.0	18.3		1.867 x 10 ⁻⁵	0.00033	4.19
B	B8	13.9	1.7	14.23		1.61 x 10 ⁻⁴	5.313 x 10 ⁻³	9.4
B	B41	7.0	0.2	9.03		.0026	0.0858	
DR	DR3	42.85	8.7	29.215		6.37 x 10 ⁻⁶	7.007 x 10 ⁻⁷	7.66
* FB	F1	23.86	0.01	12.38	**	4 x 10 ⁻⁴	0.0016	15.54

* Este resultado es únicamente el FB asociado al HLA de 43 pacientes

** El número de controles es de 200

CUADRO 9.- ALELOS DE LOS DIFERENTES LOCI DEL HLA DESEQUILIBRADOS EN DIABETICOS
DEPENDIENTES DE INSULINA

Locus	Alelo	Pacientes		Testigos		P	P _c	Rasgo Relativo
		N=43	FG	N=295	FG			
A	A2	51.2	20.0	18.3		1.867 x 10 ⁻⁵	0.00033	4.19
B	B8	13.9	1.7	14.23		1.61 x 10 ⁻⁴	5.313 x 10 ⁻³	9.4
B	B41	7.0	0.2	9.03		.0026	0.0858	
DR	DR3	42.85	8.7	29.215		6.37 x 10 ⁻⁸	7.007 x 10 ⁻⁷	7.66
* FB	F1	23.86	0.01	12.38	**	4 x 10 ⁻⁴	0.0016	15.54

* Este resultado es únicamente el FB asociado al HLA de 43 pacientes

** El número de controles es de 200

CUADRO 10.- COMBINACION DE LOS ALELOS DEL H LA EN DIABETICOS
DEPENDIENTES DE INSULINA

Combinaciones Haplotipos	No. con el Haplotipo / total de pacientes
A) De3 - F1	8/42
B) Bx DR3 <u>S</u> A9 Bx DR3 <u>S</u>	11/42 9/42
C) A1 B8 DR3 S	3/42

CUADRO 11.- TABLA DE CONTINGENCIAS ENTRE SEXO Y FACTOR B-F1

	Factor B - F1	
	+	-
MUJERES	7	18
HOMBRES	6	12

FIGURA 3

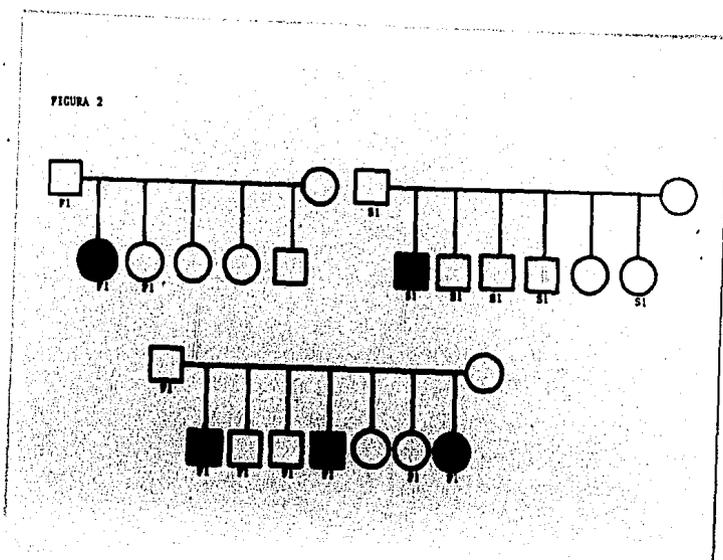
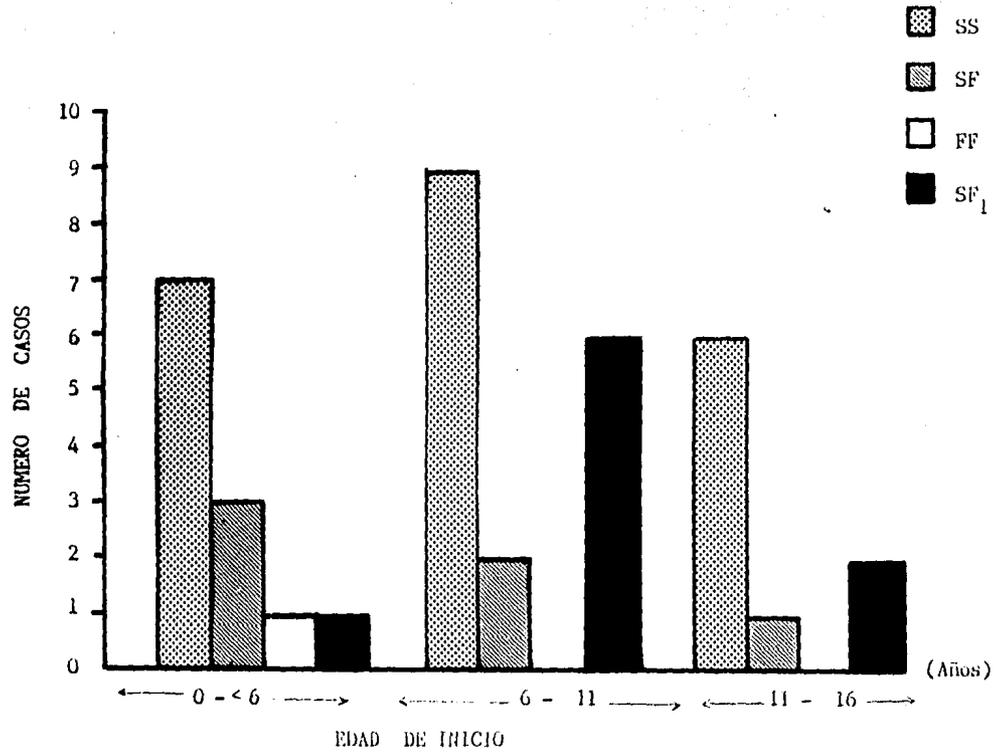


FIGURA 4



DISCUSION

En los trabajos en búsqueda de una predisposición genética asociada a los antígenos HLA, han recibido mucha importancia los antígenos de clase I y II quizá por su papel biológico propuesto, es decir su participación directa en las interacciones celulares con el antígeno que determina el control genético de la respuesta inmunológica así como en las interacciones macrofago-linfocito y linfocito-célula blanco; quedando soslayado el papel de los antígenos de clase III (todos componentes del complemento). En un papel biológico bien determinado pero ajeno a la regulación de la respuesta inmunológica. Sin embargo llama la atención que el limitado número de investigaciones relacionado a los antígenos clase III y principalmente al factor B del complemento con la diabetes tipo I haya resultado significativamente desequilibrado con el padecimiento en diferentes publicaciones incluyendo a la población mestiza mexicana.

Los resultados obtenidos nos permiten concluir que:

- 1.- El factor B F1 se asocia a la diabetes tipo I más poderosamente que ningún otro marcador como lo podemos ver con los riesgos relativos comparándolos con las otras clases del HLA. Aparecen en el cuadro 9.
- 2.- También llama la atención que el marcador a pesar de que

es un marcador raro en población sana lo que no ocurre con los otros alelos del HLA que son muy diversos dependiendo del grupo étnico como se puede apreciar en el cuadro 4, sobre todo en relación al locus B (lo cual también se observó en nuestra población ya que fue el locus de mayor diversidad comparado con los otros, ver cuadro 9).

- 3.- Dada la cercanía entre la región D y el gen del factor B es posible que hayan caído en desequilibrio de unión con gene(s) de predisposición a la diabetes y que eso explique esta asociación que tenemos no sólo en los alelos independientes sino de combinación de ellos, es decir haplotipos, ver cuadro 10.

Se estudiaron las posibles relaciones entre las 3 clases del HLA obteniendo varios de ellos significativamente asociados ahora, se apreció que no sólo el factor BF, se asocia sino también el S, que no es significativo si lo vemos como alelo independiente, en combinación sí lo es, cuadro 10. Sin embargo dá la impresión de que se reforza la asociación con el factor B con la diabetes más que los antígenos de clase II. No pretendo decir que la diabetes tipo I este determinada por los alelos del complemento sino a concluir que el gene de predisposición no está dado por el locus DR ni por el complemento, sino por un gene ubicado entre ambos loci. Lo anterior lo apoyo en los datos obtenidos en el

laboratorio en otra tesis, estudiando familias de diabéticos tipo I con factor B, figura 3, en donde se puede apreciar la existencia de familiares de enfermos sin patología que poseían el marcador involucrado, tanto así que la significancia estadística en relación entre el alelo F1 y la diabetes se pierden. Esto por un lado nos desanima en cuanto a la aplicación del posible empleo pronóstico-diagnóstico a través de la inmunogenética, sin embargo confirma la etiología multigénica de la diabetes, es decir, debe haber otros factores genéticos quizá codificados en otros cromosomas que completan la situación de predisposición así como los factores ambientales.

Se exploró la existencia de alguna relación entre la edad de inicio de la enfermedad y la presencia del factor BFI encontrándose una tendencia a acumularse en el grupo entre los 6 y los 11 años, ver figura 4; aunque no resultó significativo cuando se le aplicó la χ^2 . Asimismo se vio que no hubo diferencias en cuanto al sexo de los enfermos, cuadro 11, ésto nos llama poderosamente la atención ya que en la mayoría de las enfermedades autoinmunes se ven grandes tendencias al sexo femenino, (A.R), LES, 4 a 1 y tiroiditis 8 a 1), atribuyéndose ésto a factores endócrinos, aquí que también es autoinmune, pareciera no jugar un papel que ponga en desventaja al sexo femenino. La relación es 1 : 1

De todo lo anterior concluimos que de 68 pacientes mestizos mexicanos con DDI, encontramos asociación con los alelos del HLA: A2, B8, DR3 y el F1 del factor B del complemento con un riesgo relativo de 4.19, 9.4, 7.66 y 15.54 respectivamente, destacando la asociación del factor B F1 con este padecimiento.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Williams J.: Textbook of Endocrinology; capítulo I; Epochs in the history of diabetes. Mc Graw-Hill, 1983.
- 2.- Eisenbarth G.S. Type I diabetes: A chronic autoimmune disease. N.E.J.M. 314: 1368, (1986)
- 3.- Like, A.A., Kislaukis E., Willians, R.M., Rossini, A.A. Neonatal thymectomy prevents spontaneous diabetes mellitus in the BB/W Rat. Science 216: 644, (1982)
- 4.- Lederman, M.M., Ellrer, J.J., Rodman, H.M. Detective suppressor cell generation in juvenile onset diabetes. J. Immunol 127: 2051, (1981)
- 5.- Hodge, S.E., Anderson, C.E., Neiswanger, Field, L.L., Spence, M.A., et al clase linkage between DDM and the Kidd blood group. Lancet 2: 893, 1981.
- 6.- Gorer P.A.: The detection of antigenic difference in mouse erythrocytes by the employ of immune sera. Brit. J. Exp. Path 17: 42-5, (1936)
- 7.- Dausset J.: Iso-Leuco anticorps. Acta Haematol 20: 156-158, (1958).

- 8.- Klein J.: The mayor histocompatibility complex of the mouse, Science 203: 516-521, (1979)
- 9.- Dorf: Major Histocompatibility Complex in Immunobiology. Garland Press, New York (1981).
- 10.- Raum D. Stox S.V., Awdeh Z. Yunis E.J. y Alper C.A.: Recent advances in immunogenetics of leucocytes, plasma proteins and blood transfusion. En fairbank U.F. Ed. Haematology John Willey and Sons. N.Y. (1982)
- 11.- Otto, G.B., Dias de silva. W. Fundamentals of Immunology Ed. Springer-Verlag. Heidelberg. Nueva York (1980).
- 12.- Parham, P., McClean, J. Characterization, evolution, and molecular basis of a polymorphic HLA-A and products. A Human Immunology 1: 131-139, (1980)
- 13.- Raum D, Donaldson V.H., Rosen Sf, and Alper C.A. Genetics of Complement in Current Topics in Hematology 3: 111-174, 1980.
- 14.- Alper, C. Raum, D and Awdeh, Z.L. Studies of hepatic synthesis in vivo of plasma proteins, Including Orosomuroid, Transferrin, 1-Antitrypsin, C8 and Factor B; Clin, Immunology 16: 84-89, (1980)
- 15.- Hauptmann, G.; Sasportes, M and Kelin j.: Change in serum

- factor B phenotype followin human orthopic liver transplanta-
tion, J Immunology 124: 1524, (1980).
- 16.- Brade, V; Fries, W and Bentley, C.: Identification of proper-
din, B.D and C3 as biosynthetic products of guinea pig perito-
neal macrophages and influence of culture conditions on theis
secretion, J. Immunology 128: 1766, (1978)
- 17.- Halbwach, L. and Lachman, P.J.: Factor B of the alternative
complemente pathway on human lymphocytes. Scand. J. Immunolo-
gy 5: 697-704, (1976)
- 18.- Alper, C.A. and Böenisch, T.: Genetic polymorphismo in human
glicine-rich beta-glycoprotein. Exp. Med. 135: 68-80, (1972)
- 19.- Stosser, T.P.: Alper, C.A and Rosen F.S.: Opsonic activity
in the newborn; Role of properdin. Pediatrics 52: 134, (1973)
- 20.- Curtis, A. and Merrill, W.C.: Methods in Immunology and Immu-
nochemistry 6. Academic Press, U.S.A (1977).
- 21.- Davidson, I; Bernard, H. Diagnóstico clínico por el laborato-
rio. Salvat. España, (1978)
- 22.- Alper, C.A : Böenisch, T; Watson, L. Glycine-rich-Glycopro-
tein (GBG): Evidence for relation to the complement system
and for polymorphism in man. J. Immunology 107: 323, (1971)

- 23.- Niemann, M.A; Mole, J.E. Preliminary alignment and N-Terminal Amino Acid Sequence of the cyanogen bromide peptides of Human Factor B.J. Immunology 124: 1533, (1980)
- 24.- Margni, R.A. Inmunología e inmuoquímica. Ed. Médica Panamericana, Buenos Aires, (1977).
- 25.- Böenisch, T; Alper, C.A. Isolation and properties of a Glycine-rich -Glycoprotein of Human serum. Biochim Biophys. Acta 221: 529-535, (1970)
- 26.- Raum, D.; Donaldson, V.; Rosen, F. Genetics of complement. Current Topics in Hematology 2 111-174, (1980)
- 27.- Benacerraf B.: Role of MHC gene products in immune regulation. Science 212: 1229-1238, (1981).
- 28.- Erb. P. y Feldman M.: The Role of macrophages in the generation of T helper cells, J. Exp. Med. 142: 460, (1975).
- 29.- Katz D.F., Graves M. Dorf M.E. Dimuzio H. y Benacerraf B. Cell interactions between histocompatibility T and B lymphocytes, J. Exp. Med. 141: 263, (1975)
- 30.- Zinkernagel, R.M., Dunlop, M.B.C., Blanden, R.B., Doherty P.C. y Shreffler, D.G.: H-2 compatibility requirements for virus specific T-cell mediated cytotoxicity, J. Exp. Med. 144: 519, (1976)

- 31.- Gorodezky L.C.: Control genético de la respuesta inmunológica ligado al MHC. IPN. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Sección de graduados, Departamento de Inmunología; Examen predoctorado (1985)
- 32.- Bodmer W.F. y Cavalli - Sforza.: Genetics, evolution and man W.H. Freeman and company. San Francisco (1976)
- 33.- Lilly F.: The inheritance of susceptibility to the gross leukemia virus in mice. *Genetics* 19: 356-365, (1982)
- 34.- Svejgaard A., Morling N., Platz P, Ryder L.P.; Thomsen M. HLA and disease. Fougerau M. and Dausset J. Ed. Fourth International Congress of Immunology. Immunology 80 Academic Press, Paris 530-540 (1980)
- 35.- Schaller J.G., Omenn G.S.: The histocompatibility system and human disease. *J. of Pediat.* 88: 913-922, (1976)
- 36.- National Diabetes Data Group: Classification and diagnosis of Diabetes Mellitus and other categories of glucose intolerance. *Diabetes* 28: 1039-1057, (1979)
- 37.- Gorodezky C., Najrra R., Rangel B.E., Castro L.E., Flores J; Velázquez G., Granados J., and J. Sotelo.: Immunogenetic profile of multiple sclerosis in Mexicans. *Haman Immunology* 16: 364-374, (1986)

- 38.- Alper CA and Johnson AM, Immunofixation electrophoresis: a technique for the study of protein polymorphism. *Vox Sanguinis*. 17: 445-452, (1969)
- 39.- Danilovs, J.A., Ayoub, G., Terasaki P.I.: Blymphocyte isolation by thrombin nylon wool. Terasaki P.I. (ed). *Histocompatibility testing*. Cal., E.U.A. 287-89 (1980)
- 40.- Terasaki; P.I., Bernoco D., Park S.M., Ozturk G., Iwaki y Microdroplet testing for HLA-A, B, C and D antigens, *Am J. Clin. Path.* 69: 103-120, (1978)
- 41.- Festenstein, H., Demant P.: *Inmunogenética fundamental, Biología y aplicaciones clínicas, del HLA y H-2*. Ed. El Manual Moderno. México, D.F. 1981
- 42.- Wodlf, B. on estimating the relation between blood group and disease. *Ann Hum Genetics*. 19: 251-253, (1980)
- 43.- Ebringer, A., Cowling P., Nogaa S.N., Janes D.C. HLA and Disease. Bausset J. Suejgaard A. INSERN Paris (1976)
- 44.- Kean, W.F., Anastasiades, T.P. Long term chrysotherapy. *Arthritis Rheum.* 22: 495-501, (1979)
- 45.- Rijthoven, A.W; Insulin-Dependent Diabetes Mellitus and pro-perdin factor B. *Lancet*, August 18, (1979)

46.- Bertrams, J., Baur, M., Grünekle, D., Cries, F., Association
of BfF1, HLA-B18 and Insulin-Dependent Diabetes Mellitus.
lancet, july 14, (1979)