

TESIS DOCTORAL

**ANALISIS SEROLOGICO Y MOLECULAR DEL SISTEMA
HLA Y SU RELACION CON LA SUSCEPTIBILIDAD A
LUPUS ERITEMATOSO SISTEMICO (LES) EN LA
POBLACION ESPAÑOLA.**

AUTOR M^a Dolores de Juan Echávarri

DIRECTOR: Dr. Antonio Arnaiz Villena

LUGAR DE REALIZACION: Servicio de Inmunología

Hospital Universitario

"12 de Octubre"

FACULTAD DE FARMACIA

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

1994

A mis padres, con todo mi cariño.

AGRADECIMIENTOS

- Al Dr. Arnaiz Villena, director del estudio, por la ayuda en la planificación y confección del proyecto de tesis doctoral que se presenta.

- A todos los componentes del laboratorio de Inmunología del Hospital 12 de Octubre, por el apoyo y colaboración prestados durante la realización del presente trabajo, especialmente a J.M. Martín Villa, A. Corell, J.L. Vicario, J. Martínez Laso y O. Segurado.

- A las personas que han colaborado en aspectos clínicos o técnicos del trabajo: J.J. Gómez-Reino, G. Montalbo y M.A. Díaz-Valero

INDICE

INDICE

INTRODUCCION

1. SISTEMA HLA	1
1.1. El sistema HLA. Generalidades.	1
1.2. Antígenos HLA	2
1.2.1. Antígenos de clase I	2
1.2.2. Antígenos de clase II	3
1.2.3. Antígenos de clase III: componentes de la vía clásica y alternativa del complemento.	5
1.2.4. Otras proteínas relacionadas con el sistema HLA.	6
1.3. Genes del sistema HLA.	6
1.3.1. Estructura de los genes HLA de clase I	7
1.3.2. Estructura de los genes de clase II	7
1.3.3. Estructura de los genes de clase III	9
1.3.4. Otros genes de la región de clase III	10

1.4. Estudio del polimorfismo del sistema HLA	11
1.4.1. Polimorfismo serológico del sistema HLA.	11
1.4.2. Polimorfismo genético de restricción: RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM (RFLP)	11
1.4.3. Asociación de antígenos HLA de clase II- RFLPs y polimorfismo de secuencia de DNA	12
2. SISTEMA HLA Y ENFERMEDAD	13
2.1. Mecanismos de asociación HLA-enfermedad.	14
2.2. Inmunogenética HLA de las enfermedades del tejido conectivo.	16
3.SUCEPTIBILIDAD GENETICA A LUPUS ERITEMATOSO SISTEMICO (LES)8	
3.1. El sistema mayor de histocompatibilidad y LES	21
3.1.1. Déficit de factores del complemento en el LES.	23
3.1.2. Sistema HLA, aspectos clínicos y serológicos del LES.	25
OBJETIVOS	28
PACIENTES Y METODOS	29

1. DETERMINACION DEL FENOTIPO HLA	29
1.1. Antígenos de clase I: HLA-A,-B,-C,-Bw4 y Bw6	29
1.2. Antígenos de clase II: HLA-DR, -DQ.	30
1.3. Determinación de los alotipos del complemento: factores Bf, C2 y C4. .	31
2. DETERMINACION GENICA (RFLP) DE LOS ALELOS DE LOS LOCI HLA-DRB, DQA1, DQB1 (clase II) y C4 (clase III).	32
2.1. Obtención de sondas	32
2.1.1. Amplificación de sondas, lisado y obtención de plasmidos puros	32
2.1.2. Digestión de plásmidos	34
2.1.3. Electroelución y purificación.	34
2.1.4. Sondas utilizadas	35
2.2. Obtención de fragmentos de restricción (Southern blot)	36
2.2.1. Extracción de ADN genómico	36
2.2.2. Digestión con enzimas de restricción	37
2.2.3. Electroforesis en geles de agarosa	38
2.2.4. Transferencia a filtros de nylon	39
2.2.5. Marcaje radiactivo de las sondas (random priming)	40

2.2.6. Hibridación de filtros de nylon	41
2.2.7. Exposición y revelado	42
2.2.8. Deshibridación	42
2.3. Interpretación de los patrones de RFLP de los loci HLA-DRB,DQA,DQB (clase II) y C4 (clase III).	42
2.3.1. Patrones de RFLP DRB/Taq I	42
2.3.2. Patrones de RFLP DQA/Taq I	43
2.3.3. Patrones de RFLP DQB/Taq I	44
2.3.4. Patrones de RFLP C4 y 21-OH/Taq I	45
3. ASIGNACION DE SECUENCIAS DEL EXON 2 DE DQA1 Y DQB1 A PARTIR DE LOS RFLPs de HLA-DQ.	46
4. DETERMINACION DE AUTOANTICUERPOS ANTI- NUCLEARES EN SUERO	46
4.1. Inmunofluorescencia indirecta (IFI). Determinación de anticuerpos anti-nucleares y anti- DNA	46
4.2. Determinación de anticuerpos anti-antígenos extraíbles del núcleo (ENA).	48
4.2.1. Determinación de ENA por CIE e ID.	48
4.2.2. Determinación de ENA por Inmunoblotting	49

5. SELECCION DE INDIVIDUOS	50
5.1. Sanos no relacionados	50
5.2. Pacientes afectos de Lupus Eritematoso y familias.	50
5.2.1. Clasificación de los enfermos en grupos según aspectos clínicos.	51
6. ANALISIS ESTADISTICO	52
6.1. Cálculo de riesgo relativo (R.R.) y fracción etiológica (δ).	53
6.2. Programa estadístico	54
7. PREPARACION DE SOLUCIONES UTILIZADAS	56
RESULTADOS	59
1. FENOTIPOS Y GENOTIPOS ESTUDIADOS	59
1.1. Fenotipos HLA-DR , DQ y aloantígenos obtenidos en una muestra de individuos sanos no relacionados.	59
1.2. Fenotipos HLA-DR y DQ y aloantígenos obtenidos en una muestra de enfermos afectos de LES.	59
1.3. Secuencias de DQA1 y DQB1.	59
1.4. Correlación tipaje HLA clase II, serología-RFLPs.	59
1.5. Descripción de "nuevos " DNA- HLA DR-RFLPs	60
1.6. Alotipos de los factores C4 y Bf del complemento.	62

1.7.	Genes del factor C4 y 21-OH.	63
2.	PRINCIPALES MANIFESTACIONES CLINICAS Y SEROLOGICAS (AUTOANTICUERPOS) EN LOS ENFERMOS DE LES.	63
3.	ASOCIACIONES MAS RELEVANTES DEL SISTEMA HLA Y LES EN UN GRUPO DE LA POBLACION ESPAÑOLA.	63
3.1.	Antígenos de clase I,II y LES (GNPD+ y GNPD-)	63
3.1.1.	Asociaciones serológicas significativas	63
3.1.2.	Frecuencia de aloenotopos de DRB, DQA y DQB.	64
3.1.3.	Análisis de secuencias DQA y DQB	65
3.2.	Antígenos de clase III y LES	65
3.2.1.	Frecuencia de alotipos Bf y C4	65
3.2.2.	Distribución de genotipos C4 y 21-OH	66
3.3.	Valores de la fracción etiológica (δ) y riesgo relativo (RR) en los diferentes marcadores de susceptibilidad a LES.	67
3.4.	Asociaciones mas relevantes entre el sistema HLA y las manifestaciones del LES	67
3.4.1.	Asociación HLA-aspectos clínicos del LES	69
3.4.2.	Respuesta de autoanticuerpos mediada por antígenos HLA de clase II.	69

3.5. Lupus Eritematoso Sistémico y/o sus manifestaciones clínicas en 10 familias con al menos un afecto de LES.	71
DISCUSION	74
1. Contribución del sistema HLA a la susceptibilidad a padecer LES.	74
2. Ausencia de concordancia entre marcadores HLA que definen la susceptibilidad a LES en diferentes poblaciones.	76
3. Factores del complemento implicados en la patología renal GNPD en LES.	79
4. Inmunogenética de las respuestas autoinmunes anti-Sm/RNP y Ro/La.	81
5. Estudios de familias multiplex.	82
CONCLUSIONES	83
REFERENCIAS	85

1. SISTEMA HLA

1.1. El sistema HLA. Generalidades.

Todo organismo posee la capacidad de producir una respuesta de defensa frente a lo extraño, bien sean sustancias exógenas (antígenos) o injertos de trasplante (aloantígenos). En el caso del rechazo a injertos, se observó que existían una serie de moléculas que tenían una importancia decisiva para la supervivencia de los mismos. Estas moléculas eran los productos de una región determinada: antígenos codificados por un grupo de genes agrupados que se denominó Complejo Principal de Histocompatibilidad (Major Histocompatibility Complex, MHC) (Dausset, 1958; Van Rood y col.; 1958; Payne y col, 1958; Dausset y col., 1965).

Sin embargo, pronto se dedujo que la destrucción del tejido trasplantado no era la principal función del MHC. El papel fisiológico de las moléculas del MHC consiste en el fenómeno de la restricción (Zinkernagel y col.,1974). Estos antígenos están involucrados en la cooperación entre subpoblaciones linfocitarias y las células presentadoras de antígeno. Se encargan de presentar los antígenos extraños a los linfocitos T a nivel de la superficie de la membrana de células presentadoras de antígeno (CPA). Así, el receptor de la célula T reconocerá el antígeno extraño en conjunto con el antígeno MHC (en el contexto de lo propio).

Se han encontrado en todas las especies de mamíferos estudiados, sistemas principales de histocompatibilidad análogos. Los más estudiados en la actualidad, son el del ratón, denominado H-2 (situado en el cromosoma 17) y el del hombre denominado **HLA (Human Leukocyte Antigens)** (situado en el brazo corto del cromosoma 6) (Ploegh y col., 1981).

Una de las características más interesantes del sistema HLA es el gran polimorfismo que posee, con la presencia de un gran número de variantes alélicas de cada

uno de los loci genéticos que lo constituyen. El estudio del gran polimorfismo de este sistema ha sido de gran utilidad fundamentalmente en la mejora de la supervivencia en los trasplantes de órganos así como en otras áreas de la medicina.

1.2. Antígenos HLA.

El sistema HLA se comporta como un sistema dialélico, autosómico y codominante constituido por una serie de genes que codifican para un amplio conjunto de antígenos de la superficie celular que se agrupan en tres clases fundamentales:

1.2.1 Antígenos de clase I:

Dentro de este grupo se encuadran los antígenos de los loci HLA-A, -B y -C que se agrupan juntos por sus características comunes. Estos antígenos se expresan en la superficie de todas las células nucleadas, plaquetas y espermatozoides.

Estos antígenos son detectados principalmente mediante anticuerpos presentes en el suero de embarazadas (Van Rood y col., 1958) y en el suero de individuos hiperinmunizados por transfusiones. Los antígenos de clase I junto a los de clase II, actúan de marcadores para el reconocimiento de lo propio frente a lo no propio, hecho necesario en el organismo para defenderse de agresiones extrañas. Ellos tienen la capacidad de presentar antígenos **exógenos**, principalmente, a las células T citotóxicas.

Los antígenos HLA de clase I clásicos (HLA-A, -B y -C), son glicoproteínas transmembranales que constan de 2 cadenas polipeptídicas unidas no covalentemente: una cadena pesada, transmembranal, de 44 Kd de peso molecular, llamada cadena alfa y que se codifica en los loci HLA (cromosoma 6) y una cadena ligera (beta 2 microglobulina) (Figura 1) de 12 Kd de peso molecular codificada por un gen que no pertenece al sistema HLA y que se localiza en el cromosoma 15 (Orr y col., 1979 a y b).

La cadena pesada, consta de 338 aminoácidos: 274 extracitoplasmáticos, 32 ligados a la membrana celular y 32 situados en el citoplasma. La parte extracelular de la

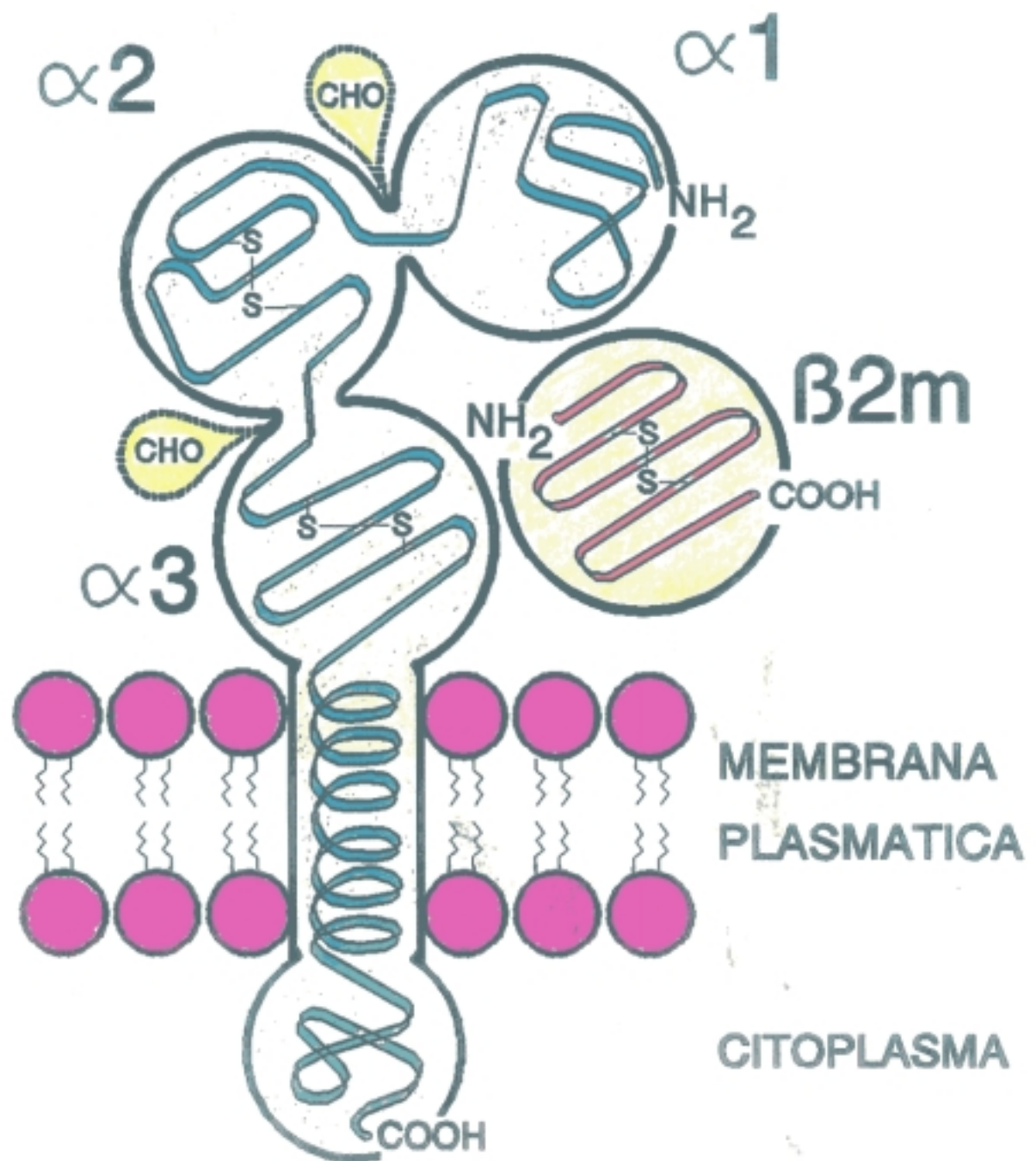


FIGURA 1. Estructura esquemática de los antígenos HLA de clase I.

molécula consta de 3 dominios de igual longitud llamados α 1 (1-90 aa); α 2 (91-182 aa) y α 3 (183-274) (Figura 1)

Los dominios α 3 y β 2 microglobulina presentan secuencias de gran homología con las regiones constantes de la cadena pesada de las inmunoglobulinas. Esto sugiere que los antígenos HLA pueden actuar como receptores (Bjorkman y col., 1987a).

En los últimos años se ha conseguido cristalizar fragmentos soluble de diferentes antígenos HLA-A2 compuesto por α 1, α 2, α 3 y β 2 microglobulina (Bjorkman y col., 1987b). En el cristal (Figura 2), los dominios alfa 1 y alfa 2 constan cada uno de una estructura de lámina β antiparalela y una hélice α . En el dominio α 2 existe un puente disulfuro que une la cadena β -amino terminal y su α -hélice más larga. Las dos estructuras beta de α 1 y 2 forman la única lámina de 8 cadenas. Por encima, paralelas entre ellas, se sitúan las 2 estructuras alfa-hélice. Entre las 2 alfa-hélices aparece una hendidura cuyo fondo viene dado por la lámina beta antiparalela. Se cree que esta hendidura representa un lugar de unión para el péptido del antígeno procesado (Bjorkman y col., 1987b).

1.2.2 Antígenos de clase II

El descubrimiento de estos antígenos vino dado por la respuesta linfoproliferativa entre individuos HLA-A,-B,-C idénticos. A este sistema se le denominó HLA-D. Posteriormente se identificaron antígenos relacionados con este HLA-D, pero ya determinados por métodos serológicos convencionales: antígenos HLA-DR (HLA-D "related") y más tarde antígenos que parecían ser especificidades públicas, denominándose: MT, MB, DC y SB. Hoy día estos equivalen a HLA-DRw52/w53, -DQ y -DP (Tanigaki y Tosi, 1982; Moller y col., 1985; Shaw y col., 1980), respectivamente.

Los antígenos de este grupo se expresan solo en unas pocas células, las cuales son las que primero entran en contacto con antígenos extraños: son los macrófagos, linfocitos B, células epiteliales, células de Langerhans.

Los antígenos HLA de clase II son glicoproteínas transmembranales que

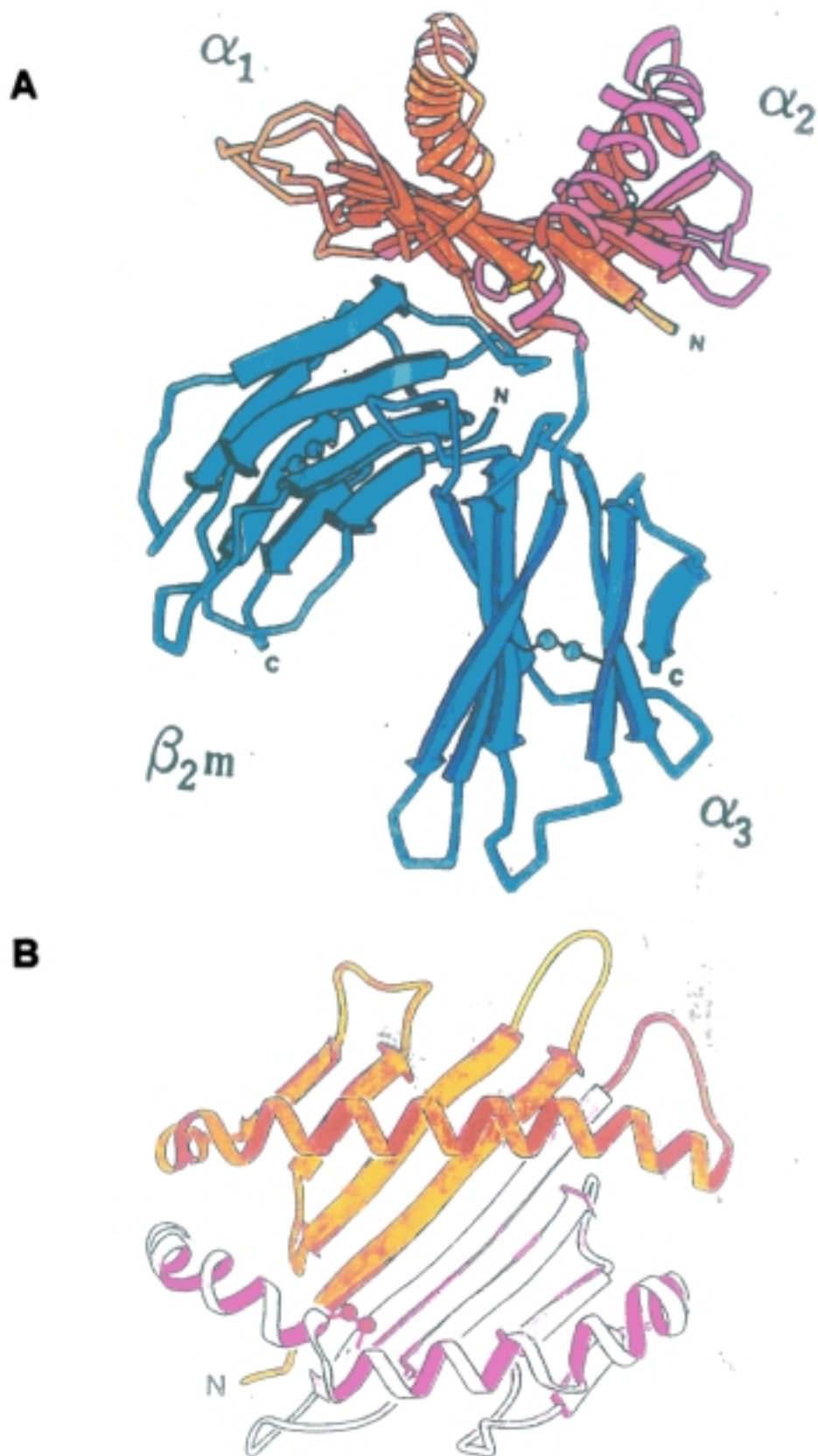


FIGURA 2. Representación de la estructura cristalográfica del antígeno HLA-A2. A) Estructura completa tridimensional B) Representación de la parte más distal de la molécula vista desde arriba.

constan de 2 cadenas polipeptídicas, una cadena pesada α de aproximadamente 34 Kd y una cadena ligera β de 28 Kd. Ambas se unen no covalentemente. Cada molécula α o β está formada por 4 dominios (Figura 3) Uno aminoterminal, distal a la membrana celular ($\alpha 1$ y $\beta 1$) de 90 aa; uno proximal de 95 aa, homólogo a las regiones constantes de las inmunoglobulinas, un péptido conector de 12 aminoácidos (aa) y una pequeña región intracitoplasmática de 8-15 aa.

Recientemente se ha logrado la cristalización de la molécula HLA DR (DR1) (Brown y col, 1993). Los resultados de este trabajo sugieren que las moléculas de clase II se agrupan en la superficie de linfocitos B y células presentadoras de antígeno formando **dímeros** (Figura 3), lo que apunta a una fuerte unión entre esta célula y el receptor de la célula T.

La determinación de las variantes alélicas de los antígenos HLA clase I y II se basa en la utilización de antisueros policlonales y anticuerpos monoclonales específicos frente a estructuras proteicas de los antígenos HLA cuya reacción se detecta por lisis mediada por complemento (ver Pacientes y Métodos, Apdo 1.1). El establecimiento de nuevas variantes se realiza en los Talleres Internacionales de Histocompatibilidad. En la tabla (Tabla 1) se muestra la lista de especificidades reconocidas en el último taller de Histocompatibilidad (Japón, Noviembre 1991.) (Bodmer y col., 1992).

En el estudio del sistema HLA, se hizo pronto patente el hecho de que ciertos alelos de los diferentes loci, tanto de clase I como de clase II, mostraban una asociación preferencial en el mismo cromosoma apareciendo juntos con una mayor frecuencia que la calculada a partir de la frecuencia de aparición de cada alelo. A este fenómeno se le denominó **desequilibrio de ligamiento** lo cual da lugar a los llamados supratipos o haplotipos extendidos. Se han propuesto dos hipótesis para explicar este fenómeno:

- Son combinaciones óptimas de los loci involucrados en interacciones inmunológicas y cualquier alteración por sobrecruzamiento de esta agrupación resultaría inadecuada.

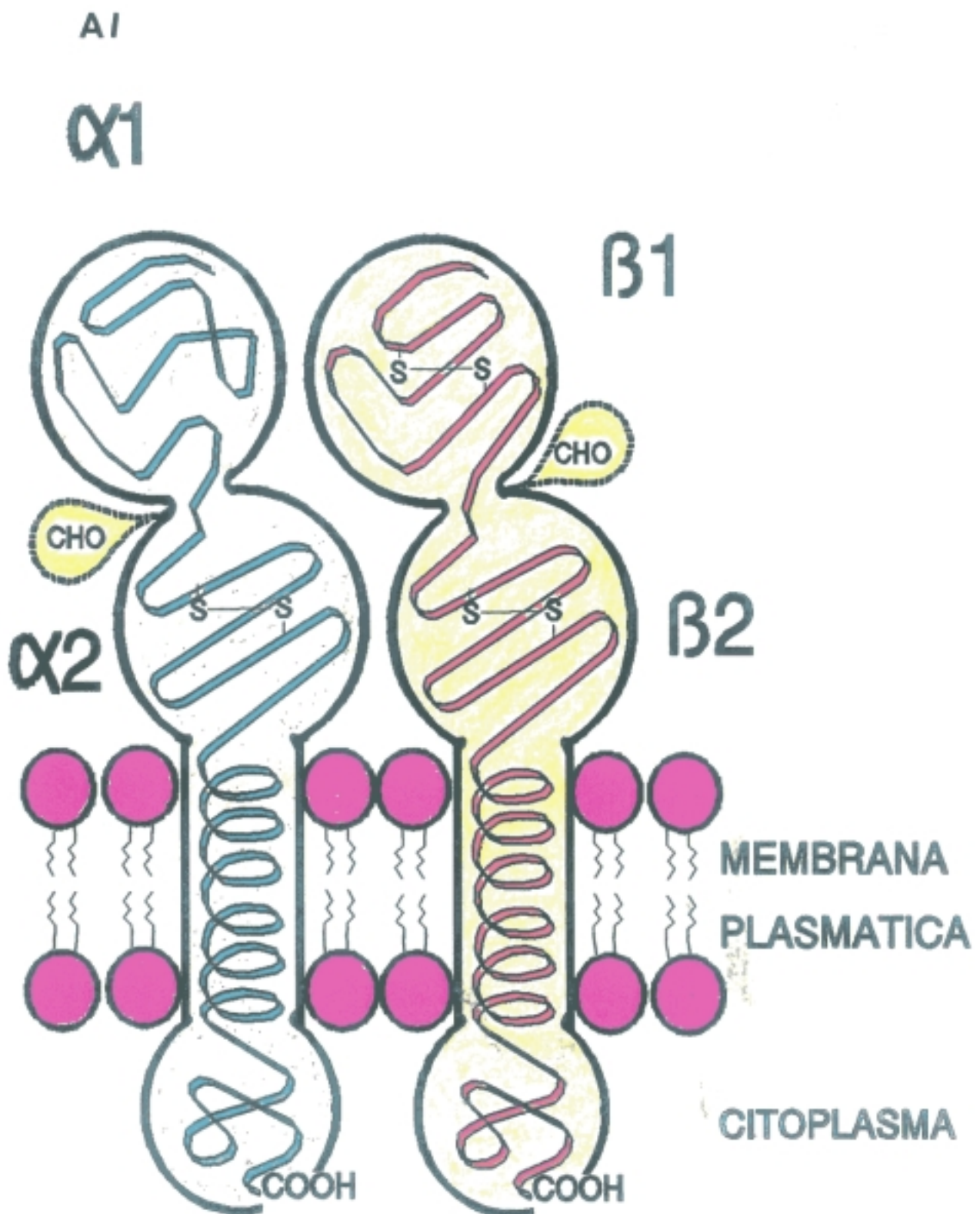
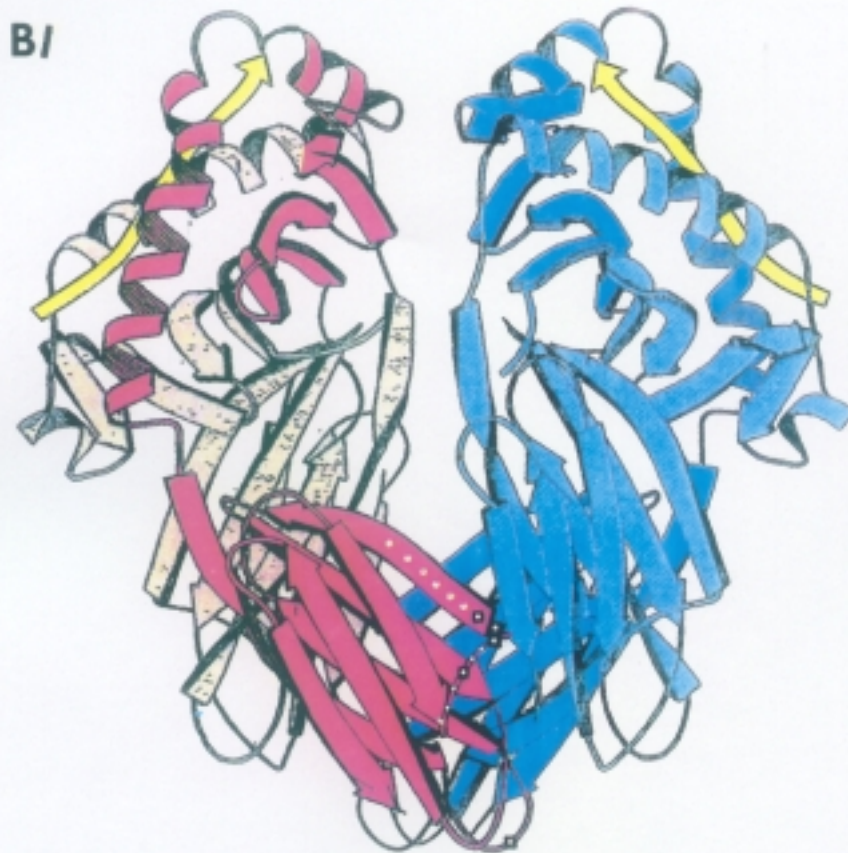


FIGURA 3. Estructura de los antígenos HLA de clase II. A) Representación esquemática



C/

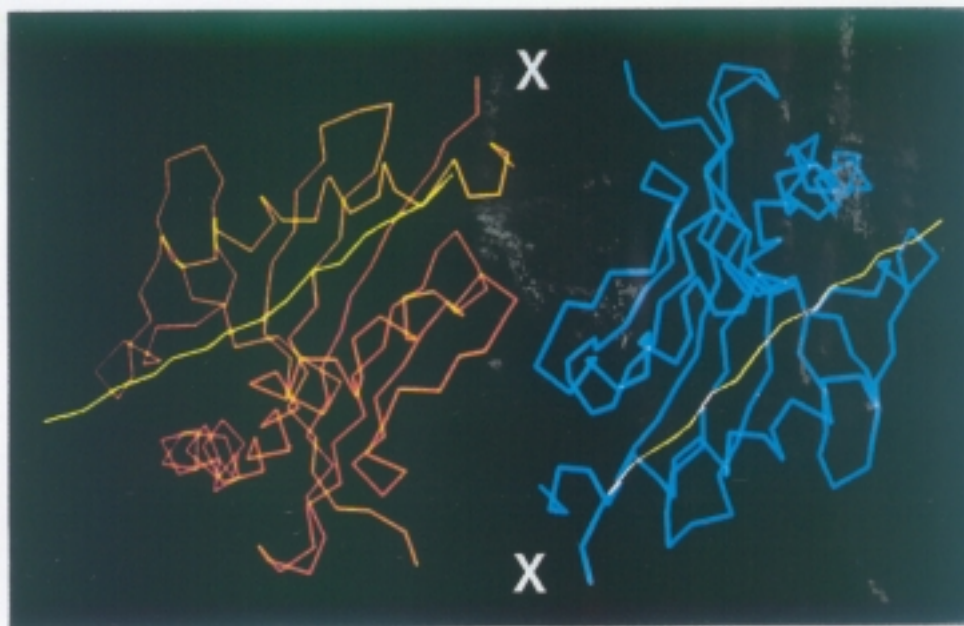


FIGURA 3 (Cont). Estructura de los antígenos HLA de clase II. Modelo del cristal de HLA-DR1 que cristaliza como un dímero de heterodímeros α - β (uno de ellos se representa en rojo y otro en azul). Las flechas amarilla indican el lugar de unión del péptido. **B)** Las cadenas α están coloreadas del tono más claro y las β más intensamente. **C)** Estructura cristalográfica del dímero vista desde la parte superior. (tomado de Brown y col., 1993).

- Los supratipos son legados de nuestros antepasados y no ha habido tiempo suficiente para que se separen.

1.2.3. Antígenos de clase III: componentes de la vía clásica y alternativa del complemento.

Los genes que codifican para las proteínas del sistema del complemento, C2, C4 y Bf pertenecen al Complejo Principal de Histocompatibilidad del hombre, al igual que en otros mamíferos. A todos ellos se les denomina antígenos HLA de clase III. Los productos de los loci C2, C4 y Bf son los responsables de la activación de la proteína PROTEÍNA, componente central de la cascada del complemento, teniendo un papel muy importante en la fase efectora de la respuesta inmune (Figura 4).

Proteína C4:

Está codificada por dos loci cercanos llamados C4A y C4B. Las proteínas codificadas por C4A y C4B poseen una homología del 99% (Carrol y Alper, 1987) pero se diferencian en la carga neta y en su actividad hemolítica (superior para C4B). La proteína C4 tiene 200 Kd y consta de 3 subunidades α , β y γ , unidas covalentemente por puentes disulfuro. Durante la activación del complemento, el fragmento C1s corta 10 Kd del extremo amino-terminal de la cadena α dando lugar al fragmento C4a. El otro fragmento C4b se une a la molécula C2 que se dividirá en C2a y C2b. El complejo C2a-C4a constituye la llamada **C3 convertasa** que forma parte de la vía clásica de activación del complemento (Figura 4).

Proteínas C2 y Bf:

Ambas tienen una única cadena glicosilada de 100Kd y 90 Kd respectivamente. C2 colabora en la vía clásica del complemento en la formación de la convertasa de C3. El factor B (Bf) se asocia con el factor C3 en la vía alternativa de activación del complemento y se generan dos fragmentos Ba y Bb, estos últimos contienen el sitio proteolítico de la convertasa. Las proteínas C2 y Bf tienen una homología del 50%. Ambas están formadas por 3 dominios globulares aproximadamente del mismo tamaño.

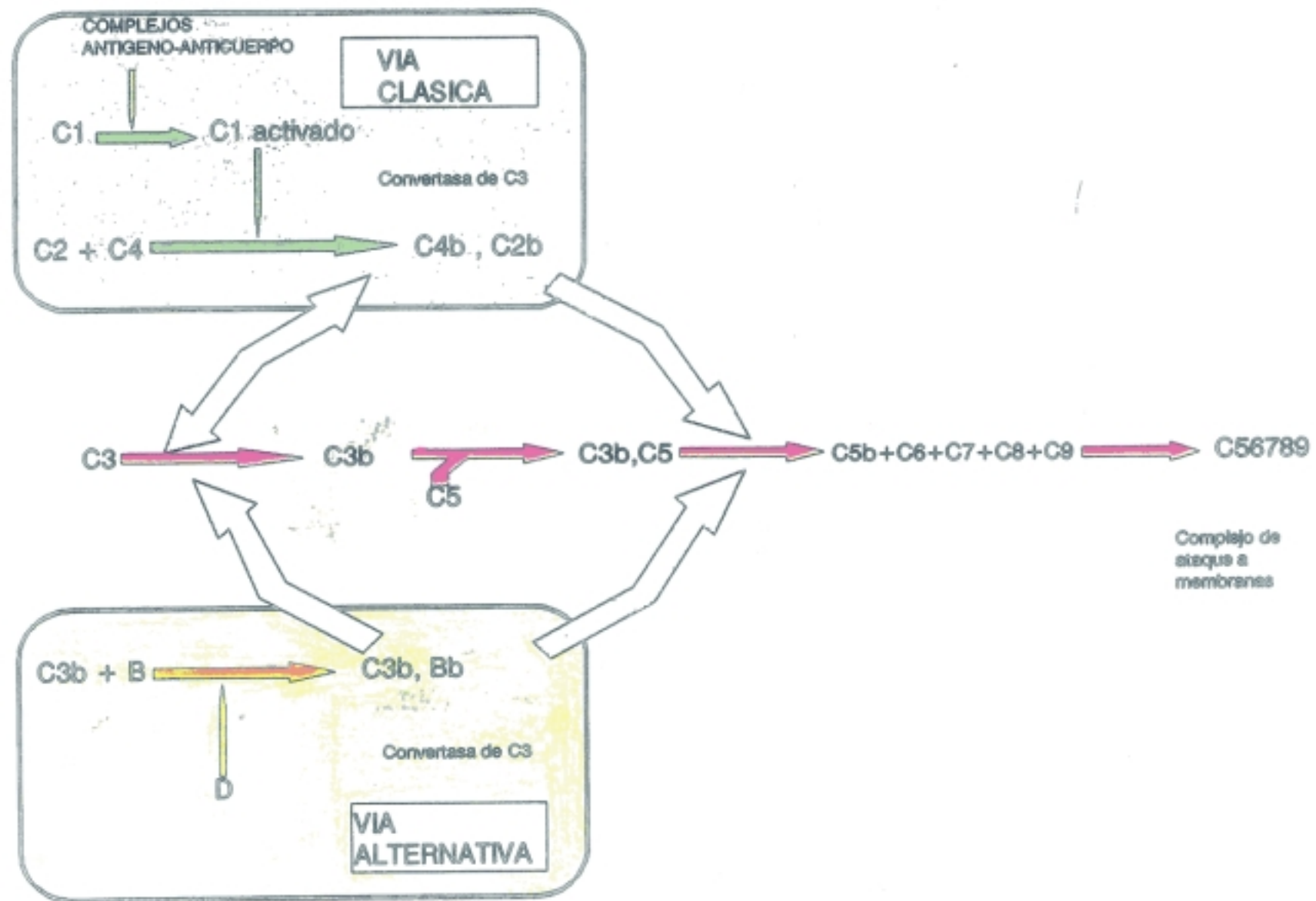


FIGURA 4. Esquema de la cascada de activación del sistema del complemento. Se puede observar la influencia de los factores C2, C4 y Bf en la activación del factor C3 (Vias alternativa y clásica).

Las variantes alélicas de C4, tanto C4A como C4B se obtienen por un proceso de electroforesis e inmunofijación con antisueros y anticuerpos monoclonales dirigidos contra molécula (Awdeh y Alper, 1980).

Del mismo modo se obtienen las variantes alélicas del factor B (Mauff y col., 1975) mientras que el polimorfismo del factor C2 se ha definido por estudios de isoelectroenfoque e inmunofijación con antisueros específicos (Campbell, 1987).

Los loci C2, C4A, C4B y Bf están íntimamente ligados. Se denomina **complotipo** al conjunto de alelos de los componentes del sistema del complemento ligados a HLA que se encuentran en un mismo cromosoma. Los complotipos segregan en bloque sin que se hayan detectado aún recombinaciones entre los loci (Alper y col., 1983).

1.2.4 Otras proteínas relacionadas con el sistema HLA.

Dentro de la región HLA en el cromosoma 6 existen multitud de genes a parte de los propiamente incluidos en este sistema. Algunos de ellos codifican para determinadas proteínas con diferente función. Entre ellos podemos destacar :

- La enzima 21 Hidroxilasa (21-OH): Consta de dos genes, originados por duplicación. Sólo uno de los dos (21-OHB) codifica para una proteína no polimórfica denominada citocromo p-450, mientras que el otro (21-OHA) es un pseudogen. La proteína p-450 es una enzima que interviene en la síntesis de esteroides por parte de la glándula adrenal. En pacientes con Hiperplasia Adrenal congénita aparece una ausencia de los genes 21-OHB y C4B en el cromosoma 6 (Globerman y col., 1988).

1.3 Genes del sistema HLA.

Los genes que codifican para los antígenos HLA de clase I, II y II ocupan aproximadamente 2 cM (0.8% del genoma humano) El mapa vigente del sistema HLA se representa en la figura 5 (Campbell y Trowsdale, 1993). Uno de los mayores avances que permitió el estudio de esta y otras regiones fue el descubrimiento de las endonucleasas de

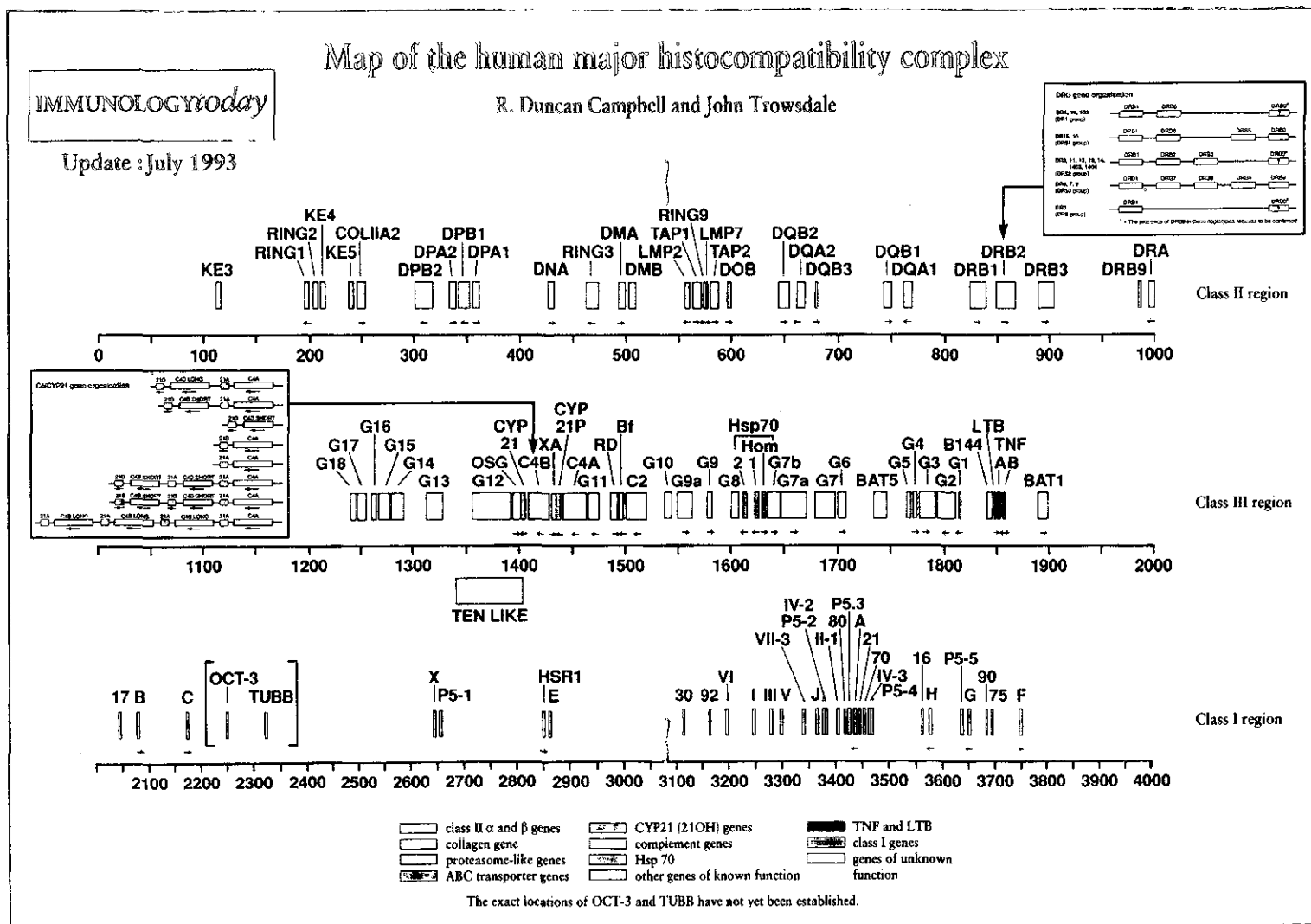


FIGURA 5. Mapa génico del Sistema Principal de Histocompatibilidad humano. Tomado de Campbell y Trowsdale, 1993).

restricción, enzimas que tienen la capacidad de romper el DNA de doble cadena en lugares específicos. Además y con la creciente disponibilidad de enzimas adicionales (exonucleasas, DNA ligasas, DNA polimerasas, transcriptasa inversa etc...) ha sido creada la tecnología denominada de **DNA recombinante**. Gracias a ella se han conseguido aislar los genes correspondientes a los antígenos HLA de clase I,II y III.

1.3.1 Estructura de los genes HLA de clase I.

En la región HLA de clase I se han descrito alrededor de 20 genes dentro de los cuales existen genes, pseudogenes y fragmentos de genes (Srivastava y col., 1985; Koller y col., 1987b; Lawlor y col., 1990; Geraghty y col., 1990).

Los primeros genes que se determinaron fueron los que codifican para los antígenos denominados de clase I clásicos: HLA-A, -B y -C. Los genes que codifican para las cadenas alfa de los antígenos A, B y C constan de 8 exones. De estos, los exones 2 a 5 codifican para los 3 dominios extracelulares $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ y el dominio de la región transmembranal (TM). El dominio citoplasmático se codifica por diferentes exones dependiendo del tipo de antígeno. Los exones 2 y 3 son los más polimórficos y coinciden con el primero y el segundo dominio proteico (Figura 6).

Por otra parte existen una serie de genes que se los ha denominado HLA de clase I no clásicos, cuya nomenclatura oficial es HLA-E, -F, -G,-H, -J y otra serie de 7 loci entre los que se incluyen varios pseudogenes. HLA-E fue el primer gen no clásico que se reconoció (Koller y col., 1987a; Srivstava y col., 1987). Su distribución de intrones y exones es similar a la de los genes de clase I clásicos HLA-A,-B y -C. HLA-G, -F, -H y -J tienen igualmente distribución intrónica/exónica parecida a los genes clásicos pero con diferencias a nivel de transcripción y traducción a proteínas (Geraghty y col., 1987) (Figura 7)

1.3.2. Estructura de los genes de clase II.

Los loci que codifican para los antígenos HLA de clase II o región HLA-D contienen 5 familias de genes llamados HLA,-DR,-DQ,-DP,-DO/DN y DM. Cada uno de

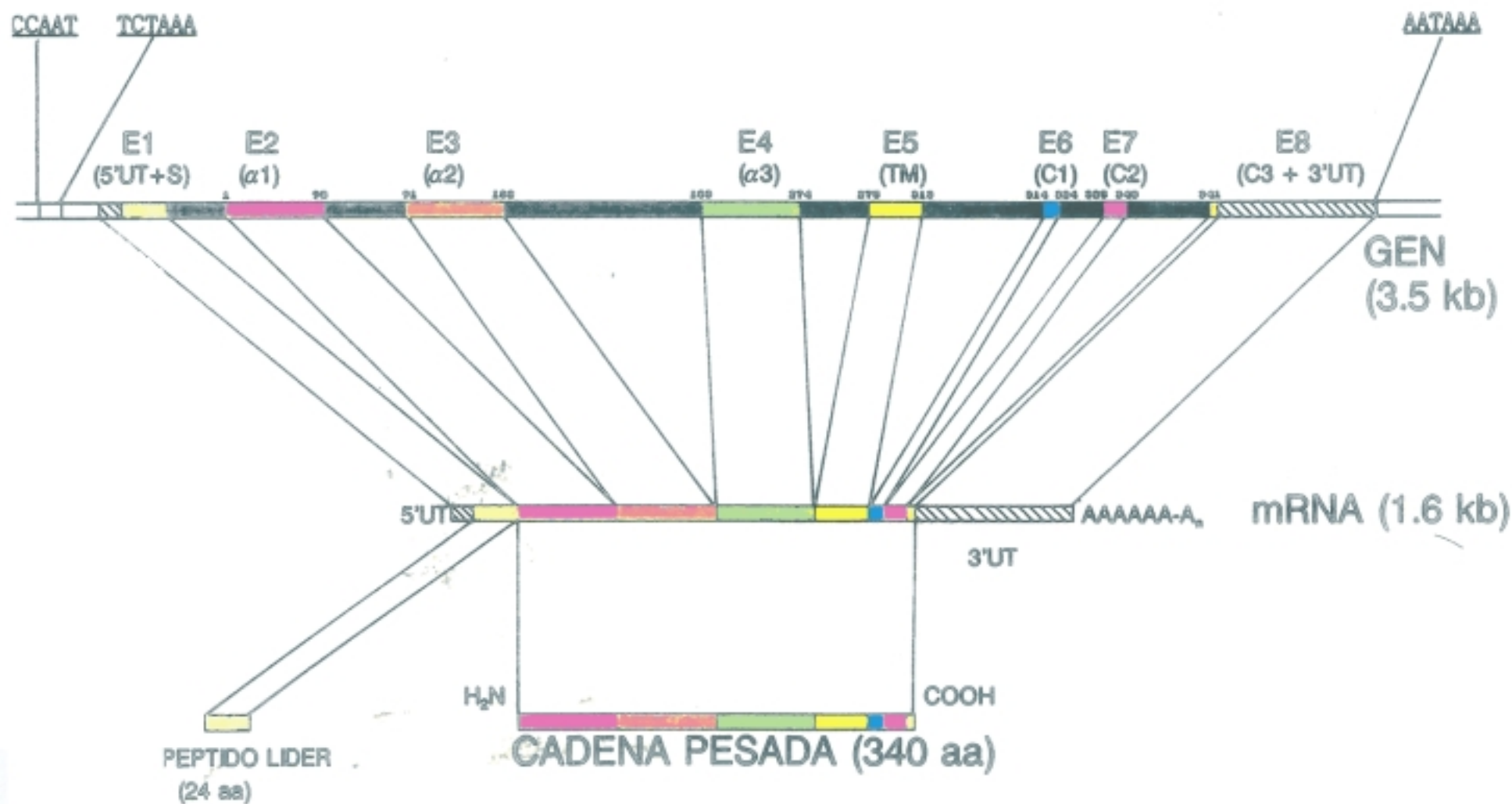


FIGURA 6. Estructura de los genes que codifican para la cadena α de los antígenos HLA clase I clásicos. Se representan los intrones (negro) y exones (coloreados) y el procesamiento a RNA mensajero.

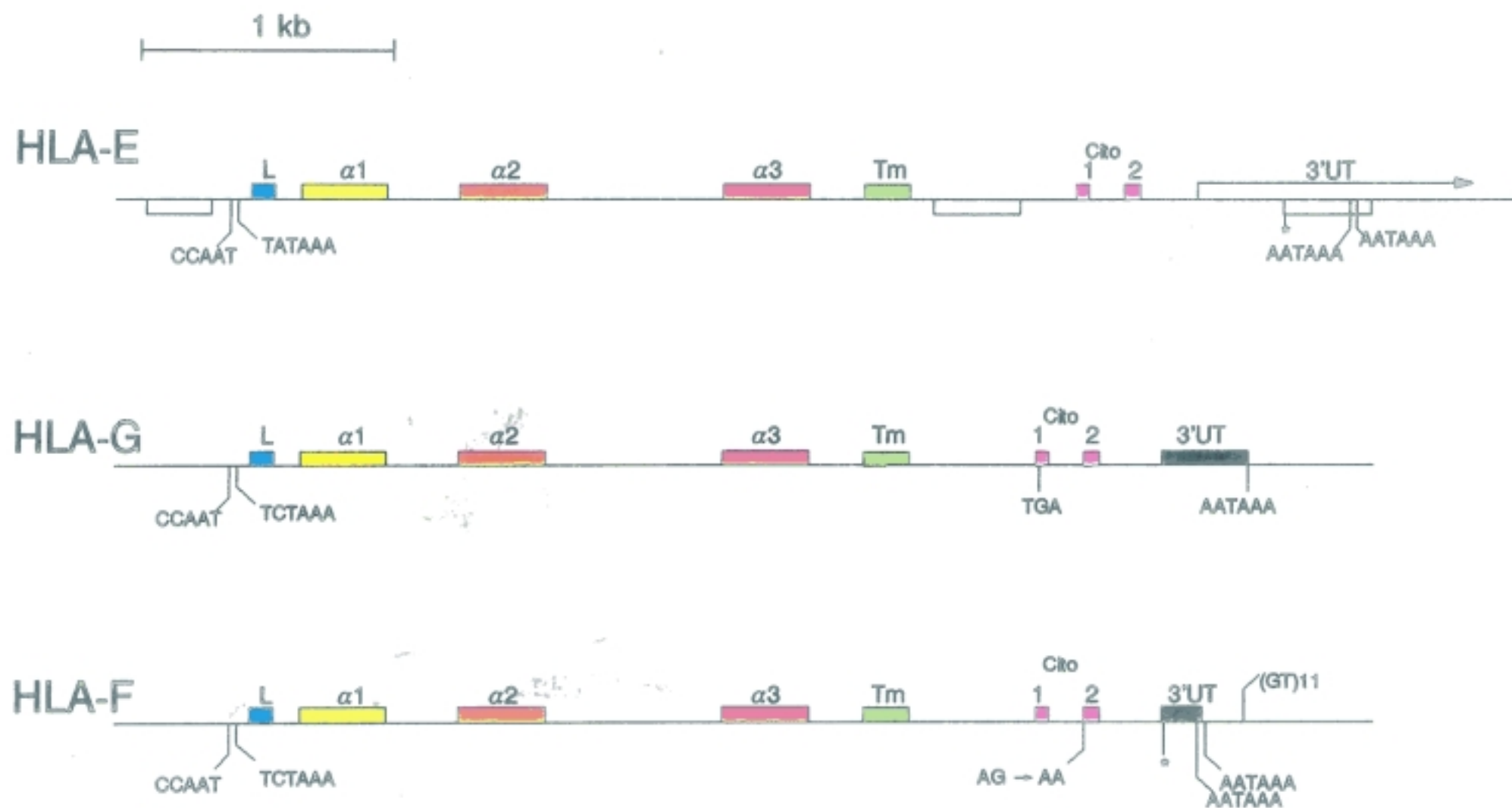


FIGURA 7. Organización de los genes HLA de clase I no clásicos. Se señalan los exones (coloreados) y los intrones (líneas negras).

ellos contiene al menos un gen para la cadena pesada (α) y otro para la cadena ligera (β) y se denominan A y B, respectivamente (Figura 8).

Familia HLA-DR:

La subregión DR se compone de un gen DRA1 que codifica para la cadena α no polimórfica; 1 gen DRB1 que codifica una cadena β polimórfica que genera todas las especificidades serológicas de la DR1 a la DR18; una serie de genes DRB que codifican para las diferentes cadenas beta: DRB3, DRB4, responsables de las especificidades DR52 y DR53, DRB5 y otra serie de pseudogenes DRB (DRB2, DRB6, DRB7 y DRB8) (Spies y col., 1985). Los genes y pseudogenes DRB presentan 5 distribuciones diferentes dependiendo de la especificidad DRB de la que se trate (Figura 9) (Andersson y col., 1987; Gorski y col., 1987; Larharmar y col., 1982; Rollini y col., 1985; Korman y col., 1985; Bell y col., 1985; Kawai y col., 1989; Merryman y col., 1988; Corell y col., 1991).

Familia HLA-DQ:

La familia DQ se compone de 5 genes. DQA1 y DQB1, que codifican para las cadenas α , relativamente polimórficas y β muy polimórficas. DQA2 y DQB2 podrían ser pseudogenes por no conocerse su expresión. Se ha descrito un quinto gen DQB3 (Ando y col., 1989) del cual no existe evidencia de expresión.

Familia HLA-DP:

La subregión DP contiene 2 pares de genes A y B. Un gen A y un gen B codifican para las correspondientes cadenas α y β funcionales. Los otros 2 genes (A2 y B2) parecen ser pseudogenes (Kelly y Trowsdale, 1985).

Familia HLA-DN/DO:

En esta familia solo existe un gen por loci (DNA y DOB) (Trowsdale y Kelly, 1985). Debido a la distancia entre ambos, parece improbable la formación de heterodímeros

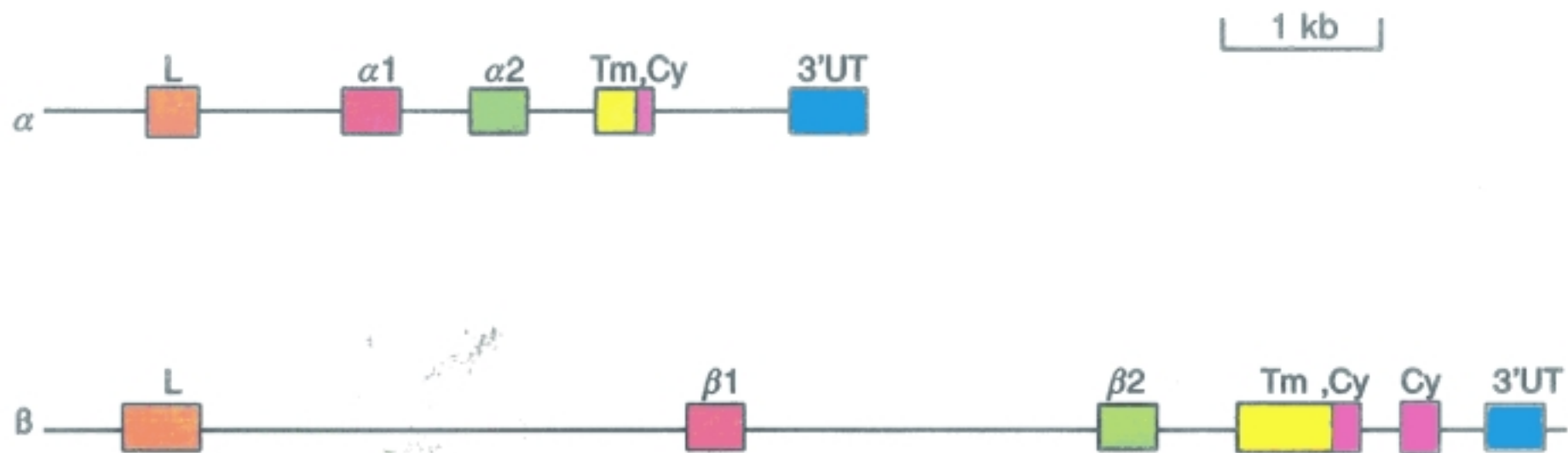


FIGURA 8. Organización de los genes HLA de clase II. Los exones (coloreados) se sitúan entre los intrones (líneas negras).

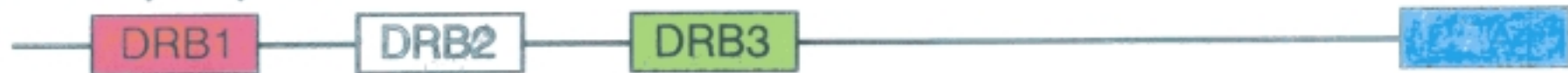
DR1, 10



DR2



DR3, 5, 6



DR8



DR4, 7, 9



FIGURA 9. Dosis génica en los diferentes haplotipos HLA-DR.

α / β entre ellos, pero no hay datos concluyentes al respecto.

Familia HLA-DM:

Los loci de esta subregión, DMA y DMB, se han descrito muy recientemente (Kelly y col., 1991 a) y se localizan entre los loci DOB y DNA. Por su secuencia de nucleótidos se situarían en una posición intermedia entre los genes de clase I y II.

Los genes que codifican las cadenas de los antígenos de clase II constan de 5 exones que incluyen el péptido líder y la región 5'UT. Dos exones para dominios α 1 y α 2 y un cuarto exón para el péptido conector, la región transmembranal, el dominio citoplasmático y la región 5' UT. Las cadenas beta se codifican por un exón para el péptido líder, 2 exones para los dominios proteicos β 1 y β 2, el cuarto exón para el péptido conector, el dominio TM y el dominio citoplasmático en parte. El resto se codifica por al menos 2 exones más (Korman y col., 1985; Trowsdale, 1987).

Otros genes de la región HLA de clase II:

Entre los loci HLA-DN y DO se han localizado una serie de nuevos genes que se pueden definir:

- a) Genes sin relación con el sistema inmunológico: por ejemplo, el gen RING 3, homólogo a un gen de la Drosophila que controla la esterilidad en las hembras (Hanson y col., 1991).
- b) Genes que codifican para proteínas involucradas en el procesamiento antigénico: LMP2 y LMP7 (Kelly y col., 1991b, Glynn y col., 1991) o en el transporte de péptidos hacia el retículo endoplásmico : TAP1 y TAP2 (Trowsdale y col., 1990, Spies y col., 1990, 1991).

1.3.3. Estructura de los genes de clase III.

Genes de C4:

Mientras que todos los genes de C4A analizados tienen una longitud de 22 Kb sólo aproximadamente el 50 % de los genes C4B miden 22 Kd (C4 B long). El 45-50% restante de los genes C4B tienen un tamaño de 16 Kb (C4B short). La diferencia en este tamaño se debe a la ausencia de un intrón en el extremo terminal en los C4B short. Debido a la elevada similitud de estas regiones (99%) se sugiere que han aparecido como consecuencia de una duplicación génica reciente (Figura 10).

Genes de C2 y Bf:

Ambos están muy cercanos entre sí. La similitud en la estructura y la función de ambos factores sugiere que estos loci aparecieron por un efecto de duplicación génica lejana en el tiempo.

1.3.4. Otros genes de la región HLA de clase III

Genes del Factor de Necrosis Tumoral (TNF):

Estos genes codifican para unas linfocinas implicadas en mecanismos de inmunidad celular. Están codificadas por 2 genes TNFA y TNFB. Cada uno tiene 3 Kb y contiene 3 intrones (Carrol y col., 1985a, 1985b).

Genes de "Heat Shock Protein 70(HSP70):

Se han encontrado 3 genes para la proteína inducida por shock térmico (Sargent y col., 1989).

Genes de la 21-Hidroxilasa (CYP21P):

Existen 2 genes: uno llamado CYP21A que es funcional y otro CPY21A que es un pseudogen debido a mutaciones deletéreas (Carrol y col., 1985a, 1985b).

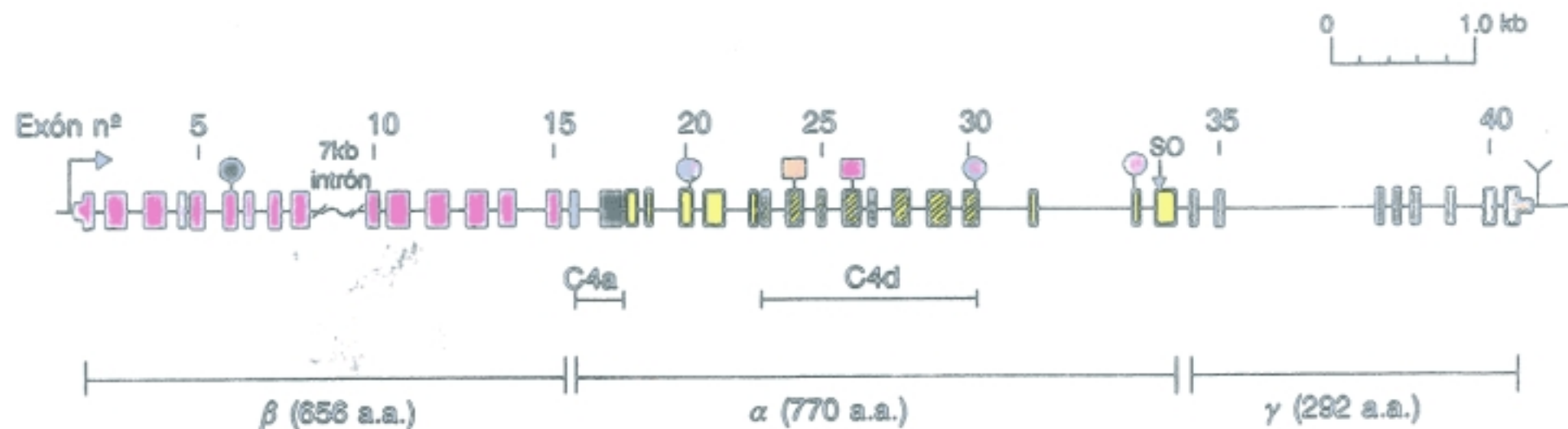


FIGURA 10. Distribución de intrones y exones del gen para el factor C4 del complemento.

1.4 Estudio del polimorfismo del sistema HLA.

El sistema HLA es extremadamente polimórfico; es decir, presenta una elevada cantidad de variantes alélicas para cada uno de sus loci genéticos . Esta característica hace que dos individuos no emparentados, tengan escasísimas posibilidades de ser HLA-idénticos. Con el avance de las técnicas de biología molecular ha sido posible el desarrollo de nuevas técnicas de tipificación del sistema HLA y ello ha permitido el descubrimiento de un polimorfismo cada vez mayor de este sistema. Así, el número de variantes que se detectan por serología es menor que las que pueden detectarse por fragmentos de restricción (RFLP) y a su vez es menor del que se puede detectar si se secuencian el ADN de los diferentes alelos.

1.4.1. Polimorfismo serológico del sistema HLA

Para que un alelo sea reconocido por las técnicas de serología es necesario disponer de sueros policlonales o monoclonales anti-HLA que permitan el reconocimiento de las diferentes especificidades. Estas nuevas especificidades se reconocen cada cuatro años en los talleres internacionales e Histocompatibilidad (Bodmer y col, 1992)(Tabla 1) De los loci citados en la tabla 1, sólo HLA-A, -B, -C, -DR y -DQ se tipifican por las técnicas de microlinfocitotoxicidad estandar, en tanto que Dw se tipifica en cultivo mixto de linfocitos frente a un panel de células homocigotas de tipaje y DP en respuesta a cultivo secundario.

1.4.2. Polimorfismo genético de restricción: RESTRICTION FRAGMENT POLYMORPHISM (RFLP).

Una de las primeras técnicas de genética aplicadas al estudio del polimorfismo HLA es la de ADN-RFLP. La técnica consiste en obtener polimorfismos genéticos basados en la presencia o ausencia de sitios de restricción (fragmentos específicos de secuencia reconocidos por endonucleasas de restricción ó RFLPs). Los RFLPs se obtienen por la técnica de Southern (Southern, 1975) en las que los fragmentos generados del gen en estudio se revelan por una sonda específica. Así se obtendrán los diferentes patrones correspondientes a los diferentes alelos del locus HLA estudiado (Figura 11). Con la

A	B	C	D	DR	DQ	DP
A1	B5	Cw1	Dw1	DR1	DQ1	DPw1
A2	B7	Cw2	Dw2	DR103	DQ2	DPw2
A203	B703	Cw3	Dw3	DR2	DQ3	DPw3
A210	B8	Cw4	Dw4	DR3	DQ4	DPw4
A3	B12	Cw5	Dw5	DR4	DQ5(1)	DPw5
A9	B13	Cw6	Dw6	DR5	DQ6(1)	DPw6
A10	B14	Cw7	Dw7	DR6	DQ7(3)	
A11	B15	Cw8	Dw8	DR7	DQ8(3)	
A19	B16	Cw9(w3)	Dw9	DR8	DQ9(3)	
A23(9)	B17	Cw10(w3)	Dw10	DR9		
A24(9)	B18		Dw11(w7)	DR10		
A2403	B21		Dw12	DR11(5)		
A25(10)	B22		Dw13	DR12(5)		
A26(10)	B27		Dw14	DR13(6)		
A28	B35		Dw15	DR14(6)		
A29(19)	B37		Dw16	DR1403		
A30(19)	B38(16)		Dw17(w7)	DR1404		
A31(19)	B39(16)		Dw18(W6)	DR15(2)		
A32(19)	B3901		Dw19(w6)	DR16(2)		
A33(19)	B3902		Dw20	DR17(3)		
A34(10)	B40		Dw21	DR18(3)		
A36	B4005		Dw22			
A43	B41		Dw23	DR51		
A66(10)	B42					
A68(28)	B44(12)		Dw24	DR52		
A69(28)	B45(12)		Dw25			
A74(19)	B46		Dw26	DR53		
	B47					
	B48					
	B49(21)					
	B50(21)					
	B51(5)					
	B5102					
	B5103					
	B52(5)					
	B53					
	B54(22)					
	B55(22)					
	B56(22)					
	B57(17)					
	B58(17)					
	B59					
	B60(40)					
	B61(40)					
	B62(15)					
	B63(15)					
	B64(14)					
	B65(14)					
	B67					
	B70					
	B71(70)					
	B72(70)					
	B73					
	B75(15)					
	B76(15)					
	B77(15)					
	B7801					
	Bw4					
	Bw6					

TABLA 1 Especificidades HLA conocidas, 1993.

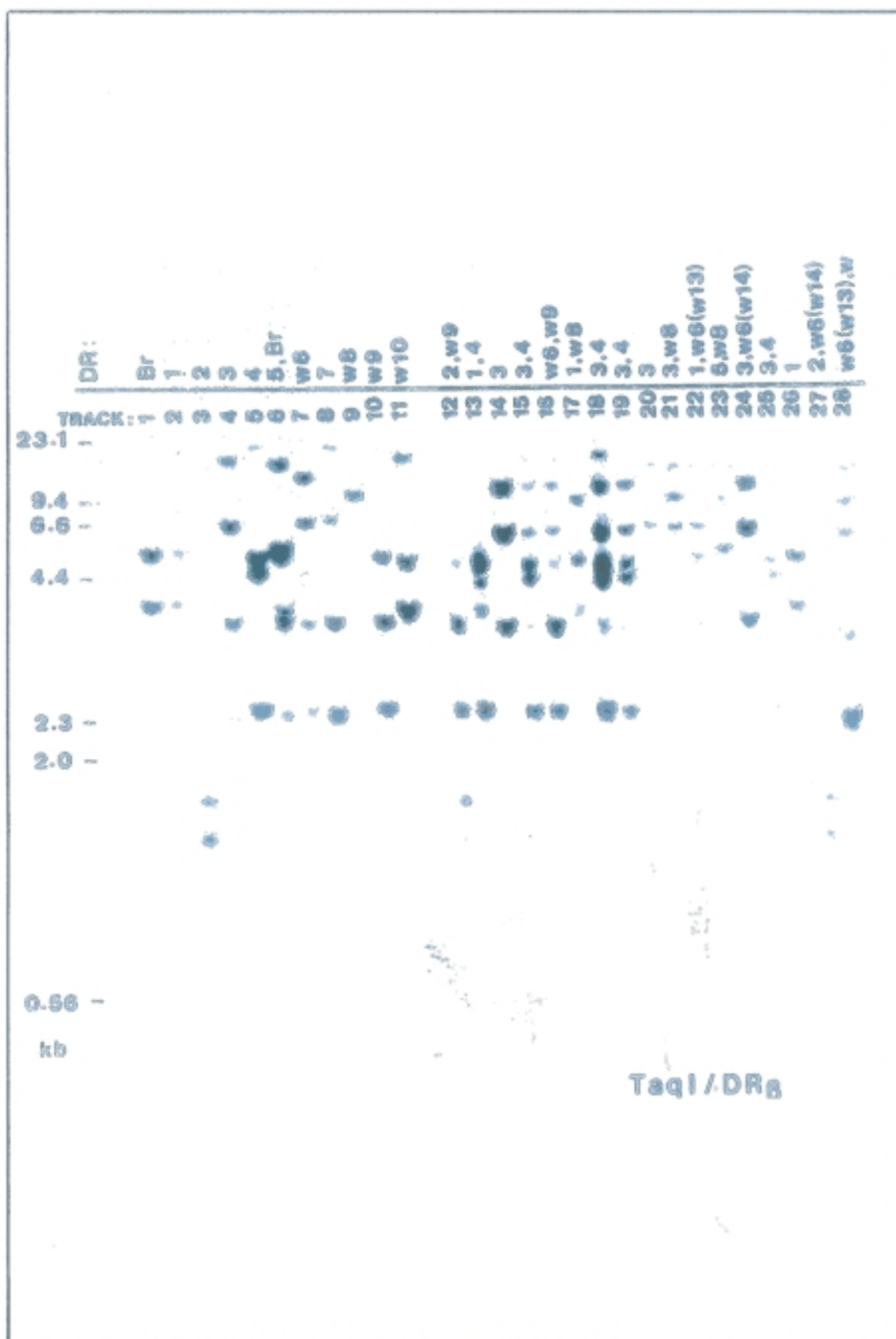


FIGURA 11. Polimorfismo de restricción. Ejemplo de los patrones de restricción de HLA-DRB con la enzima Taq-I y sonda pRTV1 para las diferentes células homocigotas de tipaje.

aplicación de estas técnicas al sistema HLA y más concretamente a los genes de clase II (Bidwell y col, 1986), la tipificación de antígenos HLA-DR y DQ es más fiable que mediante las técnicas serológicas y fundamentalmente define muchos alelos que por la serología pasan inadvertidos.

Las técnicas del polimorfismo de restricción o RFLPS también han sido aplicadas al estudio de los genes del complemento. De esta manera, se han definido un gran número de RFLPs en el locus C4 y P450c21 (Belt y col., 1984, Carrol y col., 1985, Ratanachaiyavong y col., 1989). Tienen un especial interés los patrones polimórficos definidos por la enzima Taq I ya que permiten determinar el tamaño y la organización de los genes C4 y detectar deleciones y duplicaciones de estos genes (Ver Pacientes y Métodos, Apdo 2.3.4) (Schneider y col., 1986).

1.4.3. Asociación de antígenos HLA clase II-RFLPs y polimorfismo de secuencia de DNA.

En el año 1985 y con la aparición de la PCR (Saiki y col., 1985), la cual permitía obtener un número elevado de copias de un gen determinado, fue posible la secuenciación de los genes HLA y se puso a punto un sistema de tipaje génico mediante **oligosondas**. Ello ha permitido todavía un mayor incremento de alelos definidos en el sistema HLA.

Los RFLPs en ADN de los genes DRB, DQA1 y DQB1 se han asociado a los alelos determinados por serología y tipaje Dw (Bidwell, 1988, Martinez Laso y col., 1989a, Martinez Laso y col 1989b) que a su vez han sido correlacionados con las secuencias del exón 2 de los genes DRB, DQA1 y DQB1 (Marsh y col., 1989, Vicario y col, 1991). Por lo tanto, ha sido posible asociar los aloenotopos (conjunto de fragmentos que definen un alelo) DRB, DQA y DQB con sus correspondientes secuencias en el exón 2. (Tabla 6, Pacientes y Métodos, Apdo 3).

2. SISTEMA HLA Y ENFERMEDAD

Los primeros hechos que llevaron a pensar que el sistema HLA pudiera jugar un papel en el desarrollo de enfermedades fue el descubrimiento de que genes del sistema principal de histocompatibilidad del ratón (H-2) controlaban la resistencia a virus desencadenantes de determinadas leucemias.

Desde estos primeros trabajos, se han estudiado las posibles asociaciones entre antígenos HLA y diferentes patologías, encontrándose muchos casos de alteraciones en la frecuencia de estos marcadores genéticos en los grupos de individuos afectados de una determinada enfermedad frente a las muestras de una población control sana.

Los primeros estudios en humanos descubrieron la asociación entre las diferentes enfermedades y los antígenos HLA de clase I: por ejemplo HLA-B8 y enfermedad celiaca, HLA-B13 y B17 y psoriasis. A partir de entonces se han identificado toda una serie de asociaciones entre enfermedad y el sistema HLA. Más tarde y con la posibilidad de tipificación de los antígenos HLA de clase II, se observó que la mayoría de las enfermedades presentaban una asociación más fuerte con los antígenos HLA de clase II. En la tabla 2 , se muestran las asociaciones más significativas entre las distintas enfermedades y los antígenos HLA.

Las asociaciones encontradas tienen implicaciones en el diagnóstico y profilaxis en algunas enfermedades y en otras, la asociación a HLA ha contribuido a una mejor clasificación de la enfermedad. Las asociaciones que se describen en la tabla son un consenso de todas las descritas ya que se ha observado que la asociación varía dependiendo de la población estudiada. Por ejemplo, la diabetes mellitus Insulino-dependiente en poblaciones caucasoides no españolas se asocia con los haplotipos A1 Cw7 B8 BfS C4AQ0 C4B1 DR3 DQ2 y el haplotipo Ax Cw3 Bw62 BFS C4A4 C4B2 DR4 DQ8 (Svejgaard y col., 1980, Svejgaard y Ryder, 1981) mientras que en la población española lo hace con A30 Cw5 B18 BFS C4A3 C4BQ0 DR3 DQ2 y con HLA-DR4-DQ8 (Martinez Laso y col., 1992a) y en la japonesa se asocia con DR4 y/o DR9 (Bertrans y Baur, 1984).

ENFERMEDAD	ALELO(S) HLA ASOCIADO(S)
HODGKIN	A1
HEMOCROMATOSIS IDIOPATICA	A3/B7/B14
BEHÇET	B5
HIPERPLASIA ADRENAL CONGENITA	B47/DR7
ESPONDILITIS ANKILOSANTE	B27
REITER	B27
UVEITIS AGUDA	B27
TIROIDITIS SUBAGUDA	B35
PSORIASIS	Cw6
DERMATITIS HERPETIFORME	DR3
CELIACA	A1/B8/DR3/DR7
DEFICIENCIA DE IgA	DR3/DR7
SINDROME DE SICCA	DR3
ADDISON	DR3
GRAVES	DR3
DIABETES MELLITUS INSULIN DEPENDIENTE	A1/B8/DR3 B18/DR3 B62/DR4 DR8 DR9
MIASTENIA GRAVIS	DR3
LUPUS ERITEMATOSO SISTEMICO	A1/B8/DR3 B18/DR3 DR2
NEFROPATIA MEMBRANOSA IDIOPATICA	DR3
BLOQUEO CARDIACO CONGENITO	A1/B8/DR3
NARCOLEPSIA	DR2/B7
ESCLEROSIS MULTIPLE	DR2
NEURITIS OPTICA	DR2
DEFICIENCIA DE C2	DR2
SINDROME DE GOODPASTEUR	DR2
ARTRITIS REUMATOIDE	DR4
PEMFIGO	DR4
NEFROPATIA IGA	DR4
LUPUS INDUCIDO POR DROGAS	DR4
TIROIDITIS DE HASHIMOTO	DR5
ANEMIA PERNICIOSA	DR5
ARTRITIS REUMATOIDE JUVENIL	DR5/DR8
GLOMERULONEFRITIS PRIMARIA	C4B*2.9

TABLA 2. Asociación entre antígenos HLA y enfermedades.

Podemos estudiar la asociación entre HLA y una enfermedad através de:

* Estudios poblacionales:

Analizando pacientes no emparentados y grupos control sanos igualmente no emparentados. Después se construyen tablas de contingencia 2 X 2, comparando las frecuencias para cada antígeno en las 2 poblaciones aplicando la prueba χ^2 con corrección de Yates o bien la prueba Fisher (Tabla 3), se calcula luego, el valor de significación p que ha de corregirse por el número de comparaciones realizadas. También se calculan los valores de riesgo relativo (RR), fracción etiológica (δ) y fracción preventiva (PF). El riesgo relativo indica con mayor que probabilidad se puede desarrollar una enfermedad en individuos portadores de un alelo comparándolo con individuos sanos. La fracción etiológica, EF ó Delta (δ), indica la influencia inmediata que un antígeno particular tiene en el desarrollo de la enfermedad. La fracción preventiva, PF, puede ser usada para riesgos disminuidos. Los valores de la PF y EF varían entre 0 (no asociación) y 1.0 (asociación máxima).

*Estudios familiares:

Cuando se ha establecido una asociación en individuos no emparentados es recomendable realizar estudios familiares para ver si están también implicados genes no HLA en el susceptibilidad a enfermedad. Por otra parte, enfermedades no asociadas con factores HLA conocidos pueden estar controlados por factores HLA desconocidos no asociados con aquellos conocidos. Ello sólo puede ser clarificado mediante estudios familiares. Pueden averiguarse modos de herencia (dominante/recesivo) con parejas de hermanos afectados. El sistema HLA resulta un arma muy útil en los estudios clásicos de ligamiento en enfermedades de herencia mendeliana.

2.1. Mecanismos de asociación HLA y enfermedad:

- A.- Las enfermedades asociadas a HLA pueden dividirse en 3 grupos: un pequeño grupo en el que los mecanismos inmunológicos no parecen ser relevantes en la patogenia

Análisis en las asociaciones HLA. Enfermedades

1. Pacientes no emparentados

a) Significación estadística de la desviación de frecuencias.

		Antígeno HLA		
		+	-	
		(presente)	(ausente)	
Enfermedad	+	a	b	M ₁
	-	c	d	M ₂
		M ₁	M ₂	n

M₁ = número de enfermos estudiados.

M₂ = número de sanos estudiados.

$$f = \frac{a}{a+b} = \text{frecuencia del antígeno en pacientes.}$$

$$X^2_{\text{Yates}} = \frac{(|a \cdot d - b \cdot c| - 1/2 \cdot n)^2 \cdot n}{M_1 \cdot M_2 \cdot M_3 \cdot M_4}$$

$$X^2_{\text{Yates}} \geq 3,84 \quad p \leq 0,05$$

$$X^2_{\text{Yates}} \geq 12,11 \quad p \leq 0,0005$$

p_{correcta} = p_c = p · número de antígenos estudiados.

p_{Fisher} = probabilidad exacta de que las frecuencias de un antígeno en las poblaciones enferma y sana sea la misma.

$$p_{\text{Fisher}} = \sum_{i=0}^{i=a+1} \frac{(a+b)! \cdot (c+d)! \cdot (a+c)! \cdot (b+d)!}{(a-i)! \cdot (b+i)! \cdot (c+i)! \cdot (d-i)! \cdot n!}$$

$$\text{si } \frac{a}{a+b} \text{ es menor que } \frac{c}{c+d}$$

si p = 0,05, tenemos un 95 por 100 de probabilidad (nivel de confianza) de que las frecuencias de ambas poblaciones no son iguales.

b) Estimación de la fuerza de asociación.

$$\text{Riesgo relativo (RR): } RR = \frac{a \cdot d}{b \cdot c}$$

Fracción etiológica (EF, Etiologic Fraction):

$$EF = \left(\frac{RR - 1}{RR} \right) \cdot \left(\frac{a}{a+b} \right) = \left(\frac{RR - 1}{RR} \right) \cdot f$$

Sólo en asociaciones positivas, RR > 1.

Fracción preventiva (PF, Preventive Fraction):

$$PF = \frac{(1 - RR) \cdot f}{RR \cdot (1 - f) + f}$$

Sólo en asociaciones negativas, RR < 1.

c) Modelos de herencia dominante-recesivo.

2. Estudio en familias

- a) Parejas de hermanos afectados. Modelos de herencia dominante-recesivo
- b) Padres-hijos afectados. Transmisión de la enfermedad junto con antígenos-haplotipos HLA. Método Lod Score.
- c) Haplotipos extendidos. En familias con varios descendientes. Cálculos idénticos a los puntos 1.a) y 1.b) de esta tabla
- d) Segregación preferente de antígenos/haplotipos HLA a la descendencia enferma

TABLA 3. Análisis de la asociación de los antígenos HLA a enfermedad.

de la enfermedad : Ej, el déficit de la 21-Hidroxilasa o la hemocromatosis idiopática. En general son patologías debidas a alteraciones del gen que codifica para las proteínas que son funcionalmente enzimas o receptores entre otros.

- B.- un segundo grupo,el mayoritario, donde los mecanismos inmunológicos parecen ser importantes para la patología. (enfermedades autoinmunes, generalmente), y
- C.- un grupo con una patogenia de etiologia incierta: ejemplo, la narcolepsia.

Debido al fenómeno de desequilibrio de ligamiento, al encontrar una asociación entre un antígeno HLA y una enfermedad puede ocurrir o bien que el alelo esté involucrado directamente en la patología de la enfermedad o bien que esté en desequilibrio de ligamiento con otro alelo , el propiamente patogénico. También se puede relacionar la susceptibilidad (o resistencia) a una enfermedad con los haplotipos extendidos o supratipos (Apartado I.2.2.) ya que la interacción entre los productos de varios genes puede ser involucrada en la asociación de HLA y enfermedad.

Se han dado toda serie de posibles hipótesis para dar explicación a la posible implicación del sistema HLA en enfermedad, las más conocidas se enumeran a continuación (Klein, 1990) :

a) Hipótesis del mimetismo molecular:

Esta hipótesis postula que los antígenos que son portados por determinados agentes patógenos pueden tener una homología estructural a antígenos HLA particulares por lo que el individuo que porta ese particular HLA no puede responder frente a él, es susceptible a la enfermedad causada por el agente patógeno. Así por ejemplo, un grupo de investigadores postulan que uno de los antígenos de la Klebsiella es similar a el Ag HLA-B27 y que este microorganismo sería el causante de la enfermedad Espondilitis anquilosante.

b) Hipótesis del receptor :

Las moléculas HLA funcionarían como receptores para patógenos, hormonas u otros transmisores y drogas. Así, por ejemplo, se especula que los pacientes con enfermedad celiaca poseen un receptor para el gluten y que el antígeno HLA B8, con el que se asocia la enfermedad, es imprescindible para la expresión de este receptor.

c) Hipótesis de los genes de respuesta inmune (genes Ir):

La asociación entre HLA y enfermedad es debida a que ciertos individuos son incapaces de responder a determinados epítomos críticos pertenecientes a los microorganismos que son responsables de la enfermedad. Esta falta de respuesta podría ser debida a "agujeros en el repertorio" de las células T en parte debido a un determinado haplotipo HLA.

d) Hipótesis de la alteración de lo propio:

Según esta teoría, el agente causante de la enfermedad alteraría moléculas del propio organismo y entonces éstas serían el blanco de las respuestas autoinmunes.

Es posible que todas las hipótesis sean válidas o bien que ninguna pueda explicar realmente el mecanismo de asociación HLA- enfermedad. Son necesarios múltiples estudios sobre todo a nivel de la regulación y funcionalidad del sistema HLA para determinar la verdadera etiología de la asociación HLA-enfermedad.

2.2 Inmunogenética HLA de las enfermedades del tejido conectivo

Hoy día , parece claro que los factores genéticos juegan un papel importante en la susceptibilidad y en la expresión de las enfermedades autoinmunes del tejido conectivo (conectivopatías autoinmunes) (Arnett , 1991.). Entre ellas se incluyen: Artritis Reumatoide (AR), Síndrome de Sjögren, dermatomiositis, esclerodermia (o esclerosis sistémica) y Lupus Eritematoso Sistemico, enfermedad que nos ocupa. La primera observación en cuanto a los aspectos genéticos fue la incidencia familiar de algunas de estas enfermedades. Más tarde el componente genético fue confirmado cuando se observó la asociación de estas

patologías a diferentes alelos del sistema HLA.

Con la aplicación de la moderna tecnología de genética molecular se ha comenzado a definir con más precisión los factores genéticos que determinan la aparición de respuestas autoinmunes que caracterizan a este grupo de enfermedades (Nepom, 1992). Parece claro que el componente genético predominante es el sistema HLA en muchas de ellas.

Por otra parte, los estudios en modelos animales y el análisis de la herencia en familias humanas sugieren que son enfermedades multigénicas. La falta de concordancia en la enfermedad entre gemelos univitelinos apoya la teoría de que la influencia de un factor ambiental, hasta ahora desconocido, es importante en el desarrollo de estas enfermedades.

Los estudios de inmunogenética HLA en las diferentes enfermedades reumáticas han permitido hasta ahora la identificación de genes (alelos) de susceptibilidad útiles como factores predictivos previos a la expresión clínica de la enfermedad. Por ejemplo, para la AR se ha postulado la teoría del epítipo compartido por alelos HLA-DR (DR4, DR1 etc) (Gregersen y col, 1987) de la misma manera que se ha confirmado la asociación de la espondilitis anquilopoyética al antígeno HLA-B27 (Schlosstein y col, 1973)). Los estudios de inmunogenética HLA han sido también de gran utilidad para explicar la gran heterogeneidad clínica de algunas enfermedades y ayudar a subdividirlas, por ej, es el caso de la Artritis Reumatoide Juvenil (Ansell y Albert, 1984).

En el futuro, este tipo de análisis genéticos podría ser el punto de partida para la obtención de nuevas vías terapéuticas más específicas, aplicadas a cada mecanismo patogénico en particular (Nepom, 1992). Ya se han definido tentativas terapéuticas preliminares en las enfermedades más clarificadas desde el punto de vista inmunogenético, como es el caso de la Artritis Reumatoide (Herzog y col., 1989). Los factores genéticos que determinan la aparición de muchas otras patologías relacionadas con la AR permanecen como un enigma aún sin resolver. A su vez, estos estudios se complican debido a la heterogeneidad genética y clínica de las conectivopatías autoinmunes y el elevado grado de

solapamiento que las caracteriza.

3. SUSCEPTIBILIDAD GENETICA A LUPUS ERITEMATOSO SISTEMICO

El LES es una enfermedad considerada como el prototipo de enfermedad autoinmune debido al gran número de manifestaciones clínicas y serológicas que la caracterizan. Se asocia con la producción de múltiples autoanticuerpos, especialmente anticuerpos antinucleares (ANA) y se caracteriza por la posible afectación de múltiples órganos. La enfermedad es por tanto de naturaleza extremadamente heterogénea (Kenneth y col., 1989).

Aunque tanto la etiología como la patogenia de la enfermedad aún no han sido clarificadas, es bien sabido que factores genéticos, hormonales y ambientales juegan un papel en el desarrollo de esta entidad.

Varios hallazgos apoyan la idea de que factores genéticos juegan un papel en la susceptibilidad a padecer LES:

i) Agregación en familias y estudios en gemelos.

Se ha observado una incidencia familiar de la enfermedad. Aproximadamente de entre un 10-12% de los pacientes tiene un familiar de primer grado afecto de LES (Arnett y col., 1976, Hochberg y col., 1987). También se ha encontrado una alta incidencia de autoanticuerpos o alteraciones inmunológicas en familiares "sanos" de estos enfermos.

Un estudio genético exhaustivo en un grupo de familias, con casos múltiples de LES (familias multiplex) (Bias y col., 1986), postula un modelo de herencia de la enfermedad autoinmune basado en la existencia de un gen **primario autoinmune** que determina el carácter autoinmune del individuo ("autoimmune trait") y que se hereda como un carácter autosómico recesivo. Este gen, no determinado por el momento, podría ser epistático con otros **genes secundarios** que finalmente determinarían la expresión de la autoinmunidad o el fenotipo de la enfermedad autoinmune. Los genes del MHC podrían

ser algunos de estos genes secundarios.

En las familias multiplex de LES, se observa que es más común la presencia del "carácter autoinmune" que la enfermedad autoinmune en sí y que en ausencia de este hipotético gen primario no ocurren ni la enfermedad autoinmune ni ninguna de sus manifestaciones (Bias y col., 1986).

Al igual que en otras enfermedades autoinmunes, parece evidente que otros **factores no genéticos** determinan la expresión del LES. Aunque la concordancia para la enfermedad es mayor entre gemelos univitelinos (25-70%, según diferentes trabajos) que en dicigóticos (1-3%) (Deapen y col., 1992), la falta de penetrancia total en los primeros sugiere que es necesario un factor externo para el desencadenamiento de la enfermedad. Algunos autores postulan que se trata de agentes inespecíficos ambientales que modulados por genes como los del MHC confieren susceptibilidad o no a la enfermedad (Bias y col., 1986). Otros autores sugieren que otros posibles acontecimientos como mutaciones somáticas o reordenamientos de genes implicados en el sistema inmunológico, independientes de línea germinal, podrían explicar las diferencias entre gemelos.

El LES, al igual que otras enfermedades autoinmunes tiene una mayor incidencia en el sexo femenino. El factor hormonal parece ser la explicación a este hecho. Parece probable que tanto las hormonas femeninas como masculinas modulen la aparición de autoinmunidad. Estudios de los niveles hormonales y actividad hormonal en enfermos de lupus, encuentran niveles elevados de actividad estrogénica tanto en mujeres como varones con LES (Lahita y col., 1982). Por otra parte, en el lupus murino, se ha demostrado que mientras que los andrógenos bloquean la producción de autoanticuerpos y retardan la aparición del lupus, los estrógenos pueden acelerar la enfermedad (Roubinian y col., 1977).

ii) Modelos murinos de LES:

La existencia de varios modelos murinos de LES en los que ratones de determinada cepa producen espontáneamente una patología autoinmune equivalente a la

que ocurre en el lupus humano, apoya el importante papel de los factores genéticos en esta enfermedad. Existen varias cepas murinas que desarrollan espontáneamente una enfermedad que aunque en ninguno de los casos es estrictamente igual que el lupus humano son un campo de estudio muy valioso para la investigación en el lupus. Las patologías que ocurren espontáneamente en las diferentes cepas son variadas al igual que los genes que se han implicado en su desarrollo. En el lupus murino se han identificado algunos genes que contribuyen o modulan la expresión de la enfermedad.

Los primeros genes identificados fueron los de **clase II del MHC** en la cepa murina (NZB x NZW) F₁ la cual a diferencia de las cepas parentales, no afectadas, presenta un enfermedad similar al lupus, principalmente caracterizada por la producción de altos niveles de anticuerpos anti-DNA IgG y una severa nefritis (Hirose y col, 1986). Al analizarse la contribución genética de cada cepa a la generación F₁ se observó una asociación significativa entre el haplotipo H-2^s de la cepa NZW y los rasgos de la enfermedad lúpica que aparecen en la cepa F₁.

La importancia de los genes del MHC en este modelo de lupus se confirmó más tarde al estudiar ratones congénicos NZB con el mismo MHC que la generación (NZB X NZW) F₁ y que entonces también presentaron nefritis (Kotzin y col, 1987). Pero al realizar cruzamientos de la cepa NZB con otras cepas se observó que determinados genes específicos portados por la cepa NZB parecían necesarios para determinar la expresión de la autoinmunidad en los cruces resultantes. No se conoce el mecanismo por los que las moléculas de clase II contribuyen al desarrollo de la autoinmunidad en este ratón pero parece necesario, al igual que se ha postulado para el lupus humano (Bias y col, 1986), la presencia de los genes "background" o constitutivos de estas cepas para la aparición de la enfermedad autoinmune. En este modelo murino también puede confirmarse el papel patogénico de los anticuerpos anti-DNA, con un isotipo IgG₂, fijador de complemento y cuyo título se incrementa en suero coincidiendo con la clínica de daño renal en el ratón.

Se han identificado otros genes fuera del MHC potencialmente implicados en el lupus. Entre ellos el más destacado es el **gen *lpr* (*lymphoproliferation*)**, portado por la cepa murina MRL-*lpr/lpr*. Este gen es una mutación autosómica recesiva que actúa como

un acelerador de la autoinmunidad en el contexto genético de la cepa autoinmune MRL. La cepa MRL-*lpr/lpr* se caracteriza por la producción de anticuerpos anti-DNA, nefritis por inmunocomplejos y por una acumulación de linfocitos de fenotipo CD4-,CD8- en el tejido linfoide (Cohen y col, 1991).

El papel de la mutación *lpr* se ha estudiado a diferentes niveles. Se ha observado que cuando se transfiere a cepas murinas no autoinmunes, estas adquieren la capacidad de producir anticuerpos pero no se induce la presencia de enfermedad autoinmune confirmándose así la importancia de los genes "background" o constitutivos del individuo, observada también en lupus humano. Recientemente se ha descrito que la mutación *lpr* implica también al gen que codifica al antígeno *Fas*, proteína de superficie que media la muerte celular programada o apoptosis, por lo que se ha postulado que la acumulación de células T CD4- y CD8- observada en los ratones *lpr* podría deberse a un escape de la selección tímica dependiente del un proceso de apoptosis aunque no se conoce aún el mecanismo por el que las mutaciones en el gen de apoptosis *Fas* conducen a un desarrollo acelerado de autoinmunidad. Algunos autores postulan que las células autoreactivas CD4+, responsables de la enfermedad autoinmune, pudieran escapar a los mecanismos naturales de tolerancia debido a un defecto del proceso apoptótico que ocurre en el timo (Sneller y col, 1992).

Aunque la cepa MRL-*lpr/lpr* podría ser un buen modelo de estudio de la inmunopatología más relevante del lupus humano, en la patología humana no se ha observado la linfoproliferación masiva de células T CD4- CD8-, las cuales parecen tener un papel clave en la patología murina.

3.1 El sistema Principal de Histocompatibilidad y LES :

La primera asociación descrita en el LES con un marcador genético fue con el alelo HLA de clase I: HLA-B8, en 1971 (Grumet y col., 1971). Los estudios posteriores han puesto de manifiesto que la correlación LES-HLA, al igual que para otras enfermedades autoinmunes, es mucho más fuerte con los antígenos de clase II en concreto, HLA-DR2 y DR3 (Gibofsky y col., 1978; Schur y col., 1982; Woodrow, 1988). Esta

asociación es consistente sobre todo cuando se estudian poblaciones caucasoides blancas de origen en el Oeste europeo, mientras que en otros grupos raciales, las frecuencias de los antígenos HLA asociados no son tan elevadas o simplemente no se confirman y aparecen otras nuevas asociaciones.

Así por ejemplo, en enfermos de lupus de raza negra, no se encuentra un aumento de la frecuencia del antígeno DR3 y tampoco son constantes las asociaciones con otros antígenos de clase II (Howard y col., 1986; Reveille y col., 1989; Fronck y col., 1990)

Por otra parte, los estudios de asociación a HLA realizados en enfermos de poblaciones orientales arrojan resultados discordantes con los de caucasoides y también discordantes entre sí. Parece ser que otros alelos HLA podrían estar implicados ya que se ha constatado un aumento de la frecuencia de HLA-DR4 y disminución de HLA-DR6 (Hashimoto y col., 1985; Hirose y col., 1988). Se observa también que determinados antígenos de clase III se asocian fuertemente a la enfermedad en estas poblaciones (Hawkins y col., 1987).

Cuando se comenzó el estudio de la asociación de los antígenos de clase II y el LES, se sugirió que posiblemente los diferentes resultados encontrados en los distintos grupos se debían a los problemas innatos a la determinación del tipaje de clase II de estos enfermos. Estas dificultades podrían deberse a la presencia de anticuerpos anti-linfocitarios que enmascaran los antígenos HLA o bien al escaso número de linfocitos, de pobre viabilidad, encontrado en los LES debido fundamentalmente al tratamiento inmunosupresor, entre otras posibles razones (Dunckley y col., 1986). El tipaje a nivel de DNA reduciría por tanto las diferencias en los resultados de las asociaciones dentro de poblaciones del mismo origen pero no ocurre así entre enfermos de diferentes poblaciones o razas (Woodrow, 1988).

Los genes de clase III, especialmente los alelos nulos de los componentes de la vía clásica (C4 y C2) del complemento se han implicado en la susceptibilidad a LES. Entre ellos destaca el alelo C4AQ0 cuya frecuencia está incrementada entre los LES en diferentes estudios (Ver apartado 3.1.1).

Una gran parte de los trabajos en enfermos de LES de origen caucasoide, encuentran que el haplotipo extendido A1 B8 Cw5 SC01 DR3 DQ2 se asocia fuertemente a la enfermedad. Estos hallazgos dificultan la localización del locus directamente implicado, en el caso que se trate de uno solamente, en la susceptibilidad al LES, debido a el fenómeno de desequilibrio de ligamiento entre los alelos HLA que componen este haplotipo.

Los haplotipos extendidos son asociaciones extremadamente conservadas en el mismo cromosoma de determinados alelos HLA de clase I(HLA-A, -B, y -C), clase II (-DR y -DQ) y clase III (C2, C4 y Bf) del complejo HLA(Apartado 1.2.2.). Estos haplotipos caracterizan a las diferentes poblaciones o razas. Se ha postulado que cualquiera que sea el mecanismo del mantenimiento del desequilibrio entre antígenos HLA, la ruptura de este podría implicarse en la asociación HLA-enfermedad (Arnaiz-Villena y col., 1984)

3.1.1 . Déficit de factores del Complemento en el LES.

Los déficits heredados de genes para factores del complemento, fundamentalmente los implicados en la via clásica , son uno de los ejemplos más claros de predisposición genética a la enfermedad similar al lupus ("lupus like")(Kohl y col., 1988). Esta patología esta asociada sobre todo a déficits homocigotos de los factores C1, C2 y C4 y aunque tiene baja incidencia, en todos los casos produce cuadros clínicos similares al LES).

Estos componentes del complemento juegan un papel primordial en el eficiente aclaramiento de los inmunocomplejos. La falta o un bajo nivel de alguno de ellos podría provocar un procesamiento defectuoso de los inmunocomplejos, un depósito en lugares inapropiados y finalmente síntomas característicos de enfermedad autoinmune sistémica.

En el caso de los genes C4 (C4A y C4B), los déficits heterocigotos de estos genes, los alelos C4AQ0 y/o C4BQ0 (C4A ó B nulos) son comunes en la población sana (15 y 18% respectivamente) pero son mucho más frecuentes entre enfermos de LES,

especialmente los alelos C4AQ0 (Roychoudhury y col., 1988).

En un principio se consideró a C4Q0 como un mero marcador del haplotipo A1 B8 Cw7 BfS C4AQ0 C4B1 DR3 DQ2, ligado a la enfermedad, por su desequilibrio de ligamiento con HLA-DR3 (Fielder y col., 1983;). Más tarde, se observó que C4AQ0 incrementaba su frecuencia dentro de otros haplotipos o como alelo aislado en otras poblaciones o grupos étnicos diferentes a la caucasoide. La frecuencia de C4AQ0 aparecía significativamente elevada en población negra americana, (Howard y col., 1986); población japonesa (Tokunaga y col., 1985) y china (Hawkins y col., 1988).

Por otra parte, algunos estudios encuentran que el alelo C4BQ0 y no el C4AQ0 es el implicado en la susceptibilidad a LES (Wilson y col., 1988). Estos hallazgos son ampliamente discutidos ya que se contraponen a la hipótesis comúnmente aceptada de que es el factor C4A y no el C4B el responsable del aclaramiento de inmunocomplejos, debido a la mayor avidez del primero por los grupos amino, abundantes en la superficie de los complejos antígeno-anticuerpo (Law y col., 1984).

La base molecular de los déficits de C4A y C4B parece ser muy heterogénea. Se debe a deleciones, mutaciones o conversiones génicas, algunas de ellas no determinadas hasta el momento (Fredrikson y col, 1991; Partanen y col, 1989).

El déficit homocigoto del factor C2 del complemento es el más común de los déficits homocigotos del complemento en caucasoides. Un tercio de los pacientes desarrolla LES o enfermedad Lupus-like. El estado heterocigoto ocurre en un 6-10% entre los enfermos de LES frente a un 1-2% en población sana. Los pacientes con déficit heterocigoto presentan un síndrome de afectación fundamentalmente cutánea muy parecido al denominado Lupus Eritematoso cutáneo (Stern y col., 1976).

Al igual que el factor C2, el factor B es poco polimórfico pero se conocen casos de déficit total y heterocigoto, ambos poco comunes y nunca relacionados con la patología del LES.

3.1.2. Sistema HLA y aspectos clínicos y serológicos del LES.

Las manifestaciones clínicas del LES pueden variar enormemente de un paciente a otro y es difícil predecir el curso clínico de la enfermedad en cada caso. Es posible que dos pacientes se ajusten al criterio de clasificación de LES (Tan y col., 1982) y sin embargo no compartan ninguno de los caracteres clínicos o de laboratorio que apoyan el diagnóstico. De ahí que los estudios de inmunogenética HLA hayan tratado de encontrar la posible relación entre los grupos clínicos y serológicos más homogéneos y el sistema HLA.

Se ha postulado que el sistema HLA podría ejercer su influencia sobre las diferentes manifestaciones clínicas y serológicas más que sobre la susceptibilidad a la enfermedad propiamente dicha (Harley y col., 1990). Este hecho se sugiere con fuerza en los estudios de ligamiento genético en familias multiplex (Bias y col., 1986).

En los últimos 15-20 años se han descrito asociaciones HLA y diferentes rasgos clínicos del LES tales como pericarditis, afectación pulmonar, afectación neurológica, etc...(Reveille y col., 1989; Ahearn y col., 1982). En general todas ellas débiles y no siempre confirmadas.

Algunos autores subdividen a los pacientes de LES para el estudio en pacientes con nefritis (una de las patologías más característica y grave de la enfermedad) y pacientes sin nefritis. Aunque los resultados en estos grupos no son siempre coincidentes, el grupo LES con afectación renal parece ser el más homogéneo desde el punto de vista inmunogenético.

A finales de los años 70, se descubrió que aproximadamente 1/3 de los pacientes afectos de LES presentaban en el suero anticuerpos reactivos frente a estructuras denominadas snRNAs (small nuclear RNA), componentes del núcleo o citoplasma celular y acomplexados normalmente con diferentes proteínas, las cuales contenían los epítomos frente a los que se dirigen la respuesta de autoanticuerpos. Desde entonces se han secuenciado los diferentes snRNAs y estudiado sus proteínas asociadas. La principal función de estas partículas parece ser la intervención en los mecanismos de "splicing" de los

precursores de los mRNA (Steitz y col, 1988) Las respuestas de anticuerpos frente a snRNAs son fundamentalmente de dos tipos: anticuerpos frente a los U-RNA (Uridine rich RNAs), que son los más comunes e incluyen las especificidades anti U1RNP y anti-Sm y por otro lado, la respuesta anti Ro/SSa (yRNAs) y anti La/SSb. En el contexto del LES y otras enfermedades relacionadas estas dos respuestas, aunque no excluyentes, ocurren normalmente por separado (RNP/Sm o SSa/SSb) y poseen diferentes características en cuanto a los mecanismos de iniciación y control, según postulan los diferentes autores, de la misma manera que difieren en los genes que parecen determinar la susceptibilidad a producir cada respuesta específica.

El análisis de los pacientes de LES agrupados de acuerdo con la producción de estos autoanticuerpos específicos ha revelado fuertes asociaciones con el sistema HLA y a su vez con determinados rasgos clínicos del LES. Se ha postulado que la presencia de autoanticuerpos anti SSa (Ro) y/o anti SSa/SSb (La) define dos grupos distintos de pacientes, cada uno asociado a diferentes marcadores HLA (Wasicek y Reichlin, 1982). La producción de anti-Ro/La se relacionó con un grupo de pacientes que comparten determinadas características: edad tardía de comienzo de la enfermedad; menor incidencia de lesiones renales; presencia de síndrome seco etc..., y fuerte asociación a HLA-DR3. Mientras que el grupo de pacientes con anticuerpos anti-Ro exclusivamente, se define por el alto de riesgo de afectación renal; un mayor título de anticuerpos anti-Ro y un peor pronóstico clínico y una fuerte asociación a HLA-DR2. (Harley y col., 1987).

Se ha encontrado una evidencia indirecta de que el anticuerpo anti-Ro participa en la producción de lesiones de piel (lupus neonatal) (Watson y col., 1984)) y posiblemente es el anticuerpo patogénico en los casos de bloqueo cardíaco congénito en la descendencia de madres con LES y anticuerpos anti-Ro(Buyon , 1990).

Múltiples estudios, utilizando tipaje serológico HLA, demostraron que los individuos heterocigotos para los alelos HLA-DQ1/ HLA-DQ2 tienen el mayor riesgo relativo de predisposición a la producción de anticuerpos anti-Ro o anti-Ro/La. Se postulaba así, que esta combinación heterocigota podría representar un ejemplo de interacciones epistáticas (cis o trans) entre las cadenas proteicas de los alelos HLA en la

superficie de la membrana celular (Harley y col., 1986).

Estudios posteriores pusieron de manifiesto que los niveles de anticuerpos más altos ocurrían efectivamente en estos enfermos heterocigotos DQ1/DQ2 y fueron confirmadas estas asociaciones al ser estudiadas otras poblaciones caucasoides y no caucasoides (Arnett y col., 1989a; Arnett y col., 1989b).

Las investigaciones más recientes, aplicando técnicas de DNA-RFLP; PCR (Polymerase Chain Reaction) e hibridación con oligonucleótidos específicos de secuencia (SSO), han desarrollado modelos de respuestas de autoanticuerpos anti Ro/SSb ligadas a secuencias de genes HLA (Reveille y col., 1991a). Del mismo modo se han estudiado la asociación de los genes HLA y la producción de otros anticuerpos en LES:

El grupo de anticuerpos dirigidos contra la familia de las ribonucleoproteínas ricas en uridina (U-ribonucleoproteínas): anti RNP y Sm, es específico del LES, especialmente los anticuerpos dirigidos frente a Sm. Esta respuesta es mucho más común en la población negra que en la caucasoide blanca (Arnett y col., 1988) y aún es menos frecuente en poblaciones de origen mediterráneo ó de origen hispano (Reveille y col., 1991b; Carreira y col., 1987)). Aunque no se han encontrado asociaciones consistentes entre alelos HLA y RNP o Sm, posiblemente debido a que la asociación al sistema HLA de esta respuesta es bastante débil, recientemente se ha postulado un modelo basado en la influencia de las diferentes cargas de los aminoácidos de los alelos HLA-DQ y la respuesta de anticuerpos RNP y/ó Sm (Kaneoka y col., 1992, Olsen y col., 1993).

Igualmente se han descrito asociaciones del sistema HLA y la producción de anticuerpos anti-DNA de doble cadena (DNA ds), anticuerpos altamente específicos de LES e implicados activamente en el daño renal por inmunocomplejos en el LES. El alelo HLA DQw6 podría ser un candidato para la determinación de una respuesta anti-DNA en LES, según estudios recientes (Khanduja y col., 1991)

OBJETIVOS

- 1.- Estudiar por primera vez en la población española , los marcadores serológicos HLA A, B, C, DR DQ Bf y C4 de susceptibilidad a LES.
- 2.- Realizar un estudio a nivel de genética molecular para buscar marcadores genéticos de susceptibilidad a LES, más específicos que los marcadores clásicos.
- 3.- Analizar el estudio de la asociación a antígenos HLA en diferentes subgrupos clínicos y serológicos homogéneos dentro la enfermedad.
- 4.- Valorar el grado de asociación de los alelos HLA, tanto a las distintas manifestaciones clínicas y serológicas de la enfermedad como a la susceptibilidad a padecer LES.
- 5.- Hacer una comparación de los valores del riesgo relativo (RR) y fracción etiológica (δ) de los diferentes loci (clase I, II y III) y alelos HLA de susceptibilidad a LES, determinados tanto por serología como por técnicas de genética molecular, y en los diferentes subgrupos dentro de la enfermedad.
- 6.- Analizar la asociación del sistema HLA con el LES y/o sus manifestaciones en casos familiares múltiples.

PACIENTES Y METODOS

1. DETERMINACION DEL FENOTIPO HLA

Los antígenos HLA se determinaron sobre linfocitos aislados de sangre periférica desfibrinada. La sangre se extrajo al vacío (sistema Venoject, Terumo, Japón) en tubos de vidrio de 10 ml provistos de 40-50 perlas de poliestireno de 1mm de diámetro. La desfibrinización se realizó mediante agitación rotatoria horizontal (10 mn) de los tubos, que induce la formación de coágulo de fibrina alrededor de las perlas. Se tomaron 6 ml de sangre desfibrinada y se añadieron cuidadosamente sobre 4 ml de lymphoprep (d=1.077 g/ml, GHNycomed, Noruega) procurando que no se mezclen las fases, y se centrifugaron a 1800 rpm durante 40 mn. Los linfocitos se recogieron de la interfase con una pipeta Pasteur y, después de lavarlos 3 veces con medio Hank's (Flow, Reino Unido)(10mn, 1200 rpm), se resuspendieron en un medio apropiado y a la concentración adecuada según su utilización posterior. El rendimiento es de 1×10^6 linfocitos/ml de la sangre periférica de partida. El recuento de linfocitos se realizó en una cámara de Neubauer mediante un microscopio de contraste de fase (Nikon, Japón).

Todos los medios utilizados para el aislamiento de linfocitos contenían antibióticos (Gentamicina, $40 \mu\text{g/ml}$, Ampicilina $125 \mu\text{g/ml}$, Cloxacilina, $125 \mu\text{g/ml}$) y se ajustaron a pH 7.3 con NaHCO_3 7.5% (Flow, Reino Unido).

1.1. Antígenos de clase I: HLA-A, -B, -C, -Bw4 y -Bw6.

La determinación de estos antígenos se llevó a cabo por el ensayo de microlinfocitotoxicidad sobre linfocitos totales (Mittal y col., 1968, Danilovs y col., 1980) utilizando una batería de sueros anti HLA (Tabla 4). El ensayo se basa en la especificidad de los sueros empleados, que reconocen y se fijan a los antígenos HLA sobre los linfocitos que presentan, provocando su lisis al añadir complemento (reacción positiva). Esta reacción no tiene lugar cuando los linfocitos en estudio no presentan los antígenos HLA que

ZA-63	A1	PRIMOC-37B	A33,B8,B14	PAWA	B40
FGR-853	A1	PRIMOC-115	B5	VERMER.111	B40,B13,B47
CLB-15.6	A1	PRIMOC-58B	B5	PRIMOC-257	B40,B7,B13,B47
C-131	A1	HILB-1081	B5,B53,B53	ZEMA	B40,B13,B47
PRIMOC-213	A2	HODOSI	B5,B49,B53,B63	FRE-8294	B41
ZA-67	A2	CLB-27	B5,B49,B53,B63	CLB-96	B41
SEVI-142	A2	PRIMOC-122	B5,B49,B17	McCABE	B44
BIO-112560	A2,A69	PRIMOC-13B	B7,B40	PRIMOC-123	B44
BIO-520012	A2,A26	DYRNESS	B7,B48	MUS-22289	B45,B15
76.3.10	A2,A28	PRIMOC-254	B7,B13	PLA-3599	B45,B50
XV-17	A2,A28	KLJO	B7,B60,B42,B67	CTCV-162	B49
VLC-192	A3	ROBR	B7,B42,B67	CJC-85/58	B49
PRIMOC-41-B	A3	VR-47997	B7,B27,B73	SEVI-351	B50
FGR-300	A3	TF-SCM-65	B8	MOUE	B51
PRIMOC-178	A9	CLB-70.2	B8,B59	FRE-8249	B51
OVI-1	A9	BI-21	B8	CLB-140.2	B52,B44
CLB-9.4	A9	PRIMOC-4B	B12	OSZT	B55
SEVI-120	A10	SEVI-350	B12	CLB-14.8	B55,B42,B67
FE-116	A10,A34,A66	CTM-3	B13	BIO-112270	B56
McSHERRY	A10,A19	PRIMOC-260	B13	FCR-114	B57
OSTERMAYER	A10,A43	FRE-8046	B13	VLC-112	B57
PRIMOC-145	A11	SEVI-90	B14	MLS-K160.3	B60
PRIMOC-218	A11,A3	C-598	B14	OSYS-02	B60
MS-27	A11	CLB-76	B15,B46,B57	PF-364RN	B62
HARO	A23	KOMA	B15,B35,B50,B70	WEIN	B62
BIO-120678	A23	BIO-15069	B15	CwPLA-1837	B63,B57,B44
BI-127	A24	Fe-105	B15	CLB-90.4	Cw1
TORP-2664	A24	BIO-121022	B16	Fe-124	Cw1
GRER POOL	A25	BIO-161022	B16	PRIMOC-7B	Cw2
BIO-112633	A25	SEVI-71	B17	SCHRAMEL	Cw2
CATA-1	A25,A32	BIO-114576	B17	BIO-113649	Cw3
PRIMOC-252	A25,A26	WEISSMAN	B17,B63	FRE-7279	Cw3
CLB-21	A26,A34,A66	FRE-7907	B18	OSXD-0405	Cw4
BIO-111094	A26,A11,A34,A66	Fe-31	B18	FRE-7103	Cw4
OSXK 04/05	A26	SCHERTER	B21	JAN	Cw4,Cw6
BIO-111761	A28,A33,A34	7775	B21	VR-52007	Cw4,Cw6
Fe-67	A28,A68	BIO-8204401	B22	OSZR	Cw5
FRE-7896	A29	CLB-148	B22	UZRE	Cw5,Cw8
BIO-111628	A29	BD-7.7	B27	MUE-23928	Cw6
SEVI-307	A29,A30,A31	BIO-120951	B27	CLB-147.2	Cw7,B22,B42
BIO-112459	A30	MCA-116	B27	Fe-16	Cw8,B14,B8
BIO-180636	A30	PRIMOC-34B	B35	TORP-976	Bw4
Fe-78	A31,A30	MUR-187	B35	VR-34486	Bw4
BIO-130829	A31	FRE-8028	B37	MG-260	Bw4
Fe-77	A32	Fe-142	B37	MUE-45884	Bw6
ALLA-1168.2	A32	DEWI POOL	B38	TORP-594	Bw6
VR-66747	A33	PILKINGTON	B39	VR-46031	Bw6
JASY	A33	CLB-235	B39		

TABLA 4. Lista de sueros anti-HLA clase I utilizados.

reconocen los antisueros utilizados (reacción negativa).

Los sueros anti HLA utilizados (tabla 3), incluyendo un control positivo (suero anti-linfocítico OTWH 02/03, Behring, Alemania) y un control negativo (suero humano AB Rh+), se dispusieron en placas de Terasaki especiales para tipaje (Nunc, Dinamarca) provistas de 60 pocillos de 15 μ l de volumen (1 μ l de antisuero por pocillo) se recubrieron de parafina líquida (Carlo Erba, Italia) para evitar la evaporación y se congelaron a -80 $^{\circ}$ C hasta su utilización.

Los linfocitos totales obtenidos como se indica más arriba (Apartado 1), se resuspendieron en medio Hank's a una concentración de 2.5×10^6 células/ml. Con una microjeringa (Hamilton, Nevada) provista de dispensador automático se añadió 1 μ l de la suspensión de linfocitos a cada pocillo de la placa de Terasaki. Las placas se incubaron 30 mn a temperatura ambiente, añadiéndose después 5 μ l por pocillo de complemento de conejo (Seralab, Alemania) e incubándose una hora más. Transcurrido este tiempo, las placas se tiñeron con eosina al 5% (5 μ l por pocillo, Merck, Alemania), se fijaron con formaldehído y se conservaron a 4 $^{\circ}$ C hasta su lectura (antes de 24 h). Las reacciones positivas y negativas se determinaron mediante un microscopio invertido de contraste de fase (Nikon, Japón). La cuantificación de las reacciones siguió la siguiente nomenclatura utilizada internacionalmente: 8 = más del 80% de linfocitos muertos; 6 = 60-80 % de los linfocitos muertos; 4 = 40-60- % linfocitos muertos; 1 = menos del 20 % de linfocitos muertos; 0 = reacción no valorable. Se consideran positivos los pocillos con reacciones de 8 ó 6, dudosos con reacciones de 4 y negativos con reacciones de 2 ó 1 (Figura 12).

1.2. Antígenos de clase II: HLA-DR,-DQ.

La determinación de los antígenos HLA-DR se llevó a cabo por microlinfocitotoxicidad sobre linfocitos B purificados (Danilovs y col., 1980), ya que estos antígenos están presentes en los linfocitos B pero no en linfocitos T. Los linfocitos B suponen un 10% de los totales en sangre periférica. Se aíslan a través de columnas de plástico (0.6 x 19.5 cm Winkler, California) con 60 mg de lana de fibra de nylon (Fenwall, Illinois) suavemente empaquetada y sumergida en medio RPMI 1640 (Flow, Reino Unido)

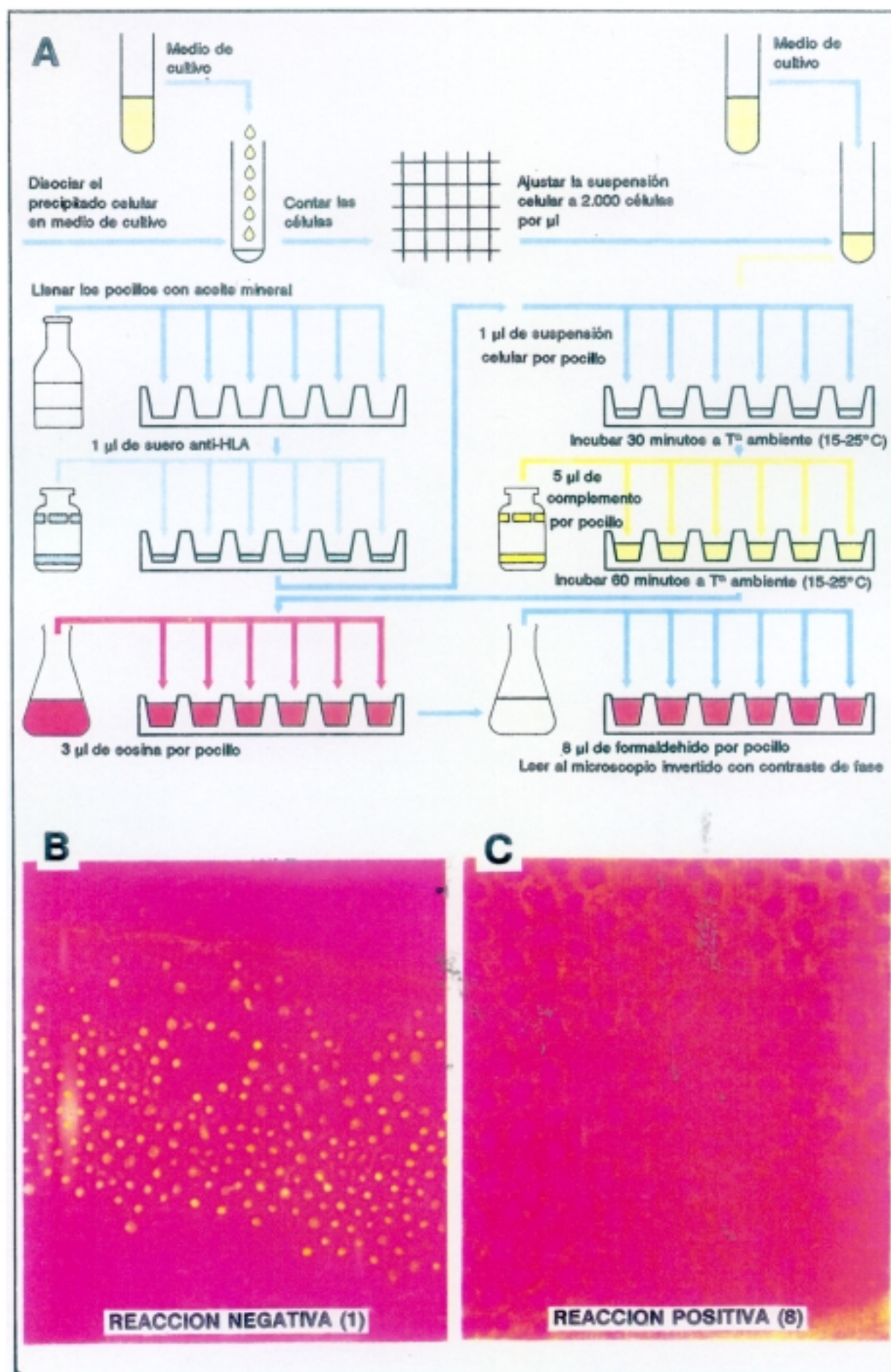


FIGURA 12. Esquema de la técnica de MICROLINFOCITOTOXICIDAD para la determinación del fenotipo HLA de clase I.

suplementado con un 10% de suero de ternera fetal descomplementado (Flow, Reino Unido). Las microcolumnas se sellaron al fuego en cuña por un extremo y se taparon con Nescofilm (Nesco, Japón) por el otro, conservándose a -80°C hasta su utilización.

Los linfocitos totales obtenidos (apartado 1), se resuspendieron a una concentración de 80×10^6 células/ml en medio RPMI 1640, un 10% de suero de ternera fetal calentado a 37°C . La suspensión celular se introdujo por la parte superior de la microcolumna, que se había lavado e incubado previamente con medio fetal 30 mn a 37°C , se selló con Nescofilm por ambos extremos y se incubó 30 mn a 37°C . Los linfocitos T se eluyeron en primer lugar haciendo pasar 20 ml de medio Fetal a 37°C a través de la lana de nylon. Los linfocitos B se extrajeron comprimiendo de arriba a abajo la lana de nylon empapada en medio fetal y lavando repetidas veces hasta completar 10 ml. Los linfocitos B se lavaron dos veces antes de su utilización (10 mn, 1.200 rpm). El rendimiento de la técnica fue del 10% de linfocitos B respecto de los linfocitos totales iniciales, y la pureza de la preparación fue del 90%. Los sueros utilizados (Tabla 5), se prepararon como se indica anteriormente (apartado 1.1).

Los linfocitos B obtenidos se resuspendieron a una concentración de 3×10^6 células/ml. Se añadió 1 μl de esta suspensión a cada antisuero y se incubó la mezcla 1 h a temperatura ambiente. Después se añadieron 5 μl de complemento de conejo y se incubó la mezcla 2 horas más. Al igual que para la determinación de los antígenos HLA de clase I y transcurrido el tiempo de incubación se tiñeron con eosina, se fijaron con formaldehído y se cuantificaron de la misma forma (Figura 12).

1.3. Determinación de los alotipos del complemento: factores Bf, C2 Y C4.

La determinación de los alotipos de los componentes del complemento Bf y C4 se realizó mediante técnicas standard de electroinmunofijación en muestras de plasma EDTA utilizando sueros de cabra anti Bf y C4 respectivamente (Atlantic antibodies, USA) (Regueiro & Arnaiz-Villena, 1988)

PRIMOC-54B	DR1	PETERSON	DR6	CTM-4	DR15
PRIMOC-56B	DR1	2378-DROZ	DR6,DR3,DR2	MRV-302	DR15
FGR-40	DR1	PRIMOC-68B	DR7	PRIMOC-255	DR52
VR-72646	DR1	FGR-108	DR7	GARIN	DR52
PRIMOC-252	DR2	PRIMOC-20B	DR7	TORP-156	DR52
PRIMOC-16B	DR2	BI-114	DR7	9866 SOH	DR52
PRIMOC-76B	DR2,DR6	HILL-1114.4	DR8	PRIMOC-191	DR53
VR-42475.9	DR2	TORP-740	DR8	OVTR	DR53
CABON-570	DR3	DS044RN	DR8,DR5	PRIMOC-122	DQ1
MUR-847	DR3	BRULE	DR9	PRIMOC-193	DQ1
KERD-509	DR3,DR6	XIV-145.8	DR9,DR52	PRIMOC-27B	DQ1
BIO-111235	DR3	ANTIN	DR9,DR7	EB-26	DQ2
PL-1501	DR3	GUILLAUME	DR10	FeMpi	DQ2
McLAREN	DR4	FRE-7608	DR10	TORP-942	DQ2
LEBORGNE	DR4	BIO-111323	DR11	PLM-12	DQ3
LH-1207	DR4	GILPIN-9276	DR11	VR-620061	DQ3
HAJO-521	DR4,DR1	VR-62424.1	DR11	Q0047	DQ3
SEVI-77	DR5	VR-64034.1	DR13,DR5	PLM-2	DQ7
PRIMOC-178	DR5,DQ7	VR-52767	DR13,DR5	A10/13	DQ7
MICAULT	DR5	PRIMOC-254	DR14,DR16		

TABLA 5. Lista de sueros anti-HLA clase II utilizados.

2. DETERMINACION GENICA (RFLP) DE LOS ALELOS DE LOS LOCI HLA-DRB, DQA1, DQB1 (CLASE II) Y C4 (CLASE III).

2.1. Obtención de sondas.

2.1.1. Amplificación de sondas, lisado y obtención de plásmidos puros con inserto.

Todas las sondas utilizadas fueron amablemente cedidas por diferentes laboratorios (apartado 2.1.4.)

Las sondas utilizadas se recibieron en el laboratorio en medio glicerol. Las sondas estaban incluidas en un vector (plásmido) crecido en E. coli y con resistencia a antibiótico específico en cada caso. Se realizó un agotamiento de asa en placas de agar GD con el antibiótico adecuado en esterilidad y se creció durante 18 h a 37°C para la obtención de colonias aisladas y homogéneas.

Se tomó una muestra de una colonia pura y se realizó un cultivo en 600 ml de medio líquido LB estéril con el antibiótico adecuado durante 18 h a 37 °C en un agitador orbital a 150 rpm. A continuación se vertieron en un Erlenmeyer de 5 l con 1400 ml de medio M9 suplementado con sulfato magnésico, cloruro cálcico y glucosa y el antibiótico. Se dejó incubando unas horas y más tarde se añadió cloranfenicol (solución stock 34mg/ml) en la proporción de 5 ml por cada litro de cultivo y se incubó otras 18 horas en agitador orbital a 37 °C y 150 rpm.

Los cultivos se centrifugaron en botellas de 1l a 4000 rpm durante 30 mn. El sobrenadante se desechó por decantación y el precipitado se resuspendió en una solución de TE 50:1. A partir de este momento hay que trabajar en hielo (de 0 a 4 °C). El volumen obtenido anteriormente se completó hasta 25 ml con TE 50/1. Se añadieron 5 ml de lisozima preparada en agua destilada a una concentración de 32 g/l unos minutos antes y conservada en frío. Esta mezcla se agitó suavemente en todas direcciones y se incubó en hielo durante 30 mn. Posteriormente se añadieron 4 ml de EDTA 0.5 y 1.9 ml de Dodecil Sulfato Sódico (SDS) al 10% y se agitó suavemente 10 mn hasta que la viscosidad fue

completa. El lisado así obtenido se conservó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ al menos 18 horas.

En el momento de hacer la separación del plásmido en gradiente de cloruro de cesio, se descongeló el lisado (preferiblemente a $56\text{ }^{\circ}\text{C}$), y se trasladó a tubos transparentes de policarbonato. Se centrifugó a 3.000 rpm durante 30 mn a 4°C , se recogió el sobrenadante y se desechó el precipitado. Por cada ml de sobrenadante se añadió 1 g de CsCl y 0.1 ml de Bromuro de Etidio. Se agitó suavemente, evitando la luz y se repartió en tubos para ultracentrífuga (Quick-seal, Beckman, EEUU) añadiéndoles parafina hasta completar el volumen del tubo. Se ultracentrifugó a 45000 rpm durante 40 a 48 horas y a $15\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Al finalizar la centrifugación, se visualizaron, con una lámpara ultravioleta (UV), dos bandas formadas en el gradiente, una debida al DNA bacteriano (superior) y otra al DNA del plásmido (inferior). Se recogió la banda correspondiente al plásmido con jeringa estéril evitando arrastrar el DNA bacteriano. A continuación se extrajo el bromuro de Etidio mediante un tratamiento con butanol (un volumen igual). Se mezcló bien y se dejó reposar hasta que se formaron dos fases, desechando la orgánica. Se repite el proceso de 5-7 veces.

La fase acuosa resultante, que contenía el DNA del plásmido, se depositó en bolsas de diálisis y se dejó dializando 18 h frente a 1l de TE10/1 pH 8.0 a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. El dializado se extrajo dos veces con solución PCI y 8 con cloroformo/Isoamílico (24/1), y se precipitó con dos volúmenes de etanol absoluto y NaCl 150 mM, durante 18 h a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para luego centrifugarlo a 10000 rpm 15 mn. Se deshecha el sobrenadante, secando el precipitado en el liofilizador y finalmente se resuspendió en TE 1/0.1.

Para estimar la concentración del plásmido se midió la absorbancia a 260 y 280 nm teniendo en cuenta que una unidad de absorbancia a 260 nm corresponde a una concentración de 50ug/ml y que el cociente 260/280 nos da el grado de pureza del DNA que si es correcto debe estar en un valor de 1.8-2.0.

Para comprobar la pureza del plásmido presente en la muestra, se realizó una electroforesis en agarosa al 0.7% (tampón TEA 1X y Bromuro de Etidio (Br Et)). La

preparación del gel se realiza según se describe en el apartado 2.2.2 . En los extremos del gel se introdujo un marcador de peso molecular (fago lambda digerido con la enzima de restricción Hind III).

2.1.2. Digestión de plásmidos

Primeramente se realiza un control de digestión. A 1 μ g de la muestra se le añadieron 5-10 unidades de enzima adecuada (según especificase el laboratorio proveedor de la sonda), el tampón correspondiente y agua. Se incubó la mezcla 37 °C durante 1 h.

Después de la incubación se realizó una electroforesis en un minigel de agarosa al 0.7 % en presencia de Br Et, a 10V/cm durante 90 mn. Se incluyen en calles paralelas marcadores de peso molecular para identificar correctamente sonda y vector y controlar el funcionamiento de la digestión. Cuando fue necesario la utilización de más de una enzima, se repitió el proceso cuidando de utilizar las enzimas en orden creciente de fuerza iónica de sus respectivos tampones.

Después de un control de digestión satisfactorio, se realizó una digestión de 100 μ g de sonda a la que se añadieron de 500 a 1000 unidades de enzima, el volumen adecuado del tampón correspondiente y agua bidestilada. Se incubó la mezcla de reacción , 18 horas a 37°C (excepto para Taq I que fue de 65°C). En el caso de que se tratara de una doble digestión se incubó al menos 4 horas con la primera enzima y luego 18 horas con la segunda.

2.1.3. Electroelución y Purificación.

Mediante este método, los fragmentos de sonda son recuperados de los geles de agarosa. Para ello se utiliza un concentrador electroforético ISCO (Isco, Inc, Nebraska, EEUU) siguiendo las instrucciones indicadas por el proveedor. El sistema concentra macromoléculas tomando ventaja de su movilidad electroforética y de la forma de la copa donde se introduce la muestra. Se realiza una electroforesis (tampón TEA 1X con Br de Etidio, durante 90 minutos a 90 V). Al final del proceso la muestra tras migrar hacia el

ánodo acaba concentrada en el pocillo de concentración, de donde se recupera, apta para su purificación posterior.

La purificación de la sonda se realiza pasando la muestra concentrada a través de una minicolumna Elutip-d (Schleicher y Schüll, RFAy), siguiendo las instrucciones del suministrador. Brevemente, se prepara la minicolumna Elutip-d inyectando 3 ml de NaCl 1.0 M en TE (20mM Tris-HCl pH 7.4, EDTA 1mM) a través de la columna con una jeringa de 5 ml. A continuación, con la misma jeringa, se inyectan 5 ml de Na Cl 0.4 M en TE. Posteriormente, se inyecta con una jeringa de 1 ml el producto obtenido en la electroelución previamente llevado a una concentración de 0.3 M de NaCl. Luego se procedió a lavar la columna con 400 ml de NaCl 0.4 M en TE. Finalmente se eluyó la muestra con uno ó más volúmenes de 200 ml de NaCl 1.0 M en TE, recogiendo el eluido en tubos eppendorf (1.5 ml).

Posteriormente se hace una precipitación con etanol (como se describe en el apartado 2.2.1), para una mayor purificación de la sonda. Posteriormente se procedió a resuspender la muestra en agua destilada ó TE 1/0.1 a una concentración de 5mg/ml, controlando la concentración por mediciones espectrofotométricas a 260 nm y mediante un gel, como se describe en el apartado 2.2.2.

2.1.4. Sondas utilizadas.

Todas las sondas utilizadas fueron amablemente cedidas por diferentes laboratorios. Estas fueron:

- pTRV1. Fragmento de Pst I de 517 bp de un clon de cDNA HLA-DRB exón específico (Bidwell y Jarrod, 1986).
- pDCH1. Fragmento de Pst I de 797 bp de un clon de cDNA de HLA-DQA (Auffray y col., 1982).
- pII-B-1. Fragmento de Ava I de 627 bp de un clon de cDNA de HLA-DQB

(Larharmar y col., 1982).

- pAT-A. Fragmento de Sal I/Hind III de 5.5 Kb de un clon de cDNA de C4 (Belt y col., 1984).
- pC21a. Fragmento de Pst I de 490 bp de un clon de cDNA de 21-OH (White y col, 1986).

2.2. Obtención de fragmentos de restricción (Southern Blot)

2.2.1. Extracción de DNA genómico.

Se realiza la extracción de DNA a partir de leucocitos de sangre periférica. Se partió de 20-30 ml de sangre venosa extraída al vacío en tubos con EDTA K 3 (Terumo, Japón). Después de centrifugar la muestra durante 5 minutos a 2500 rpm, se separó el plasma sobrenadante y se añadió a la sangre tampón de lisis de eritrocitos (Red Cell Lysis Buffer, RCLB) hasta un volumen de 50 ml. Después se procedió a una centrifugación a 1500 rpm 10 minutos, desechando el sobrenadante. El proceso anterior se repitió dos veces más.

El precipitado resultante se resuspendió en 2 ml de tampón RCLB y se añadió tampón de lisis de células blancas (White Cell Lysis Buffer, WCLB) con proteinasa K, 0.2 mg/ml WCLB hasta un volumen final de 15 ml. La mezcla se incubó durante 18 horas a 42 °C con agitación (150 rpm).

Posteriormente se procedió a la extracción de DNA con solución PCI (Fenol-Cloroformo-Isoamílico). Tras centrifugación a 1500 rpm durante 10 mn, se añadieron 15 ml de PCI y la mezcla se llevó a un agitador orbital durante 10 mn. Se centrifugó durante 3 mn a 1500 rpm, procediendo luego a la eliminación de la fase inferior orgánica dejando la interfase. Se realiza después una segunda extracción con PCI y tras volver a centrifugar 3 mn a 1500 rpm se hicieron dos extracciones más de 5 minutos cada una con cloroformo/alcohol Isoamílico (24:1), desechando la fase inferior orgánica después de cada extracción.

Una vez separada la fase acuosa con el DNA, se precipitó con isopropanol (Carlo Erba, Italia). Para ello, se añadió un volumen de NaCl 3M para obtener una concentración final de 60 mM, añadiendo luego isopropanol absoluto hasta un volumen final de 30ml. Después se agita suavemente, hasta la formación de un precipitado, que se lavó tres veces con 4 ml de etanol al 70%, para posteriormente secar 5 minutos al vacío. El precipitado así formado, se resuspendió en TE 1/0.1 durante 30 mn en un concentrador de vacío.

La concentración final óptima fue de 200 $\mu\text{g/ml}$, se fraccionó en alícuotas de 50 μl y se mantuvieron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización.

Los procesos que siguen a continuación se resumen en la figura 13.

2.2.2. Digestiones con enzimas de restricción.

Una vez ajustados los ADN a la concentración óptima (200 $\mu\text{g/ml}$), se procedió a la **digestión** con la endonucleasa de restricción Taq I (Amersham, EEUU). Se tomaron 10 μg de cada DNA, utilizando luego 1 μg para control de digestión y los 9 restantes para la obtención de los RFLPs. El volumen pipeteado se puso en un tubo tipo eppendorf y posteriormente se añadieron en el orden indicado los siguientes reactivos: a) Agua bidestilada, en un volumen de tal manera que el buffer de la enzima de restricción quedara a una dilución 1/10 en el volumen final de digestión. b) El buffer o tampón adecuado para la enzima a una concentración 10X, siguiendo las recomendaciones de la casa comercial suministradora. c) Añadir espermidina (Sigma, EEUU) a una concentración final de 2mM (la espermidina mejora las digestiones de las endonucleasas de restricción). d) Finalmente, se añadió el volumen necesario de enzima, 50 U (5U/mg de DNA). El volumen de enzima se añadió en 3 veces, poniendo 1/3 del volumen final cada vez. Después de cada tercio, se incubó a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante una hora en un baño de agua. Después de cada incubación de una hora y antes de echar una nueva dosis de enzima, se centrifugaron los tubos en una microfuga para que la condensación producida descendiese al fondo.

Para el **control de digestión**, se preparó un gel de agarosa (Sigma tipo II,

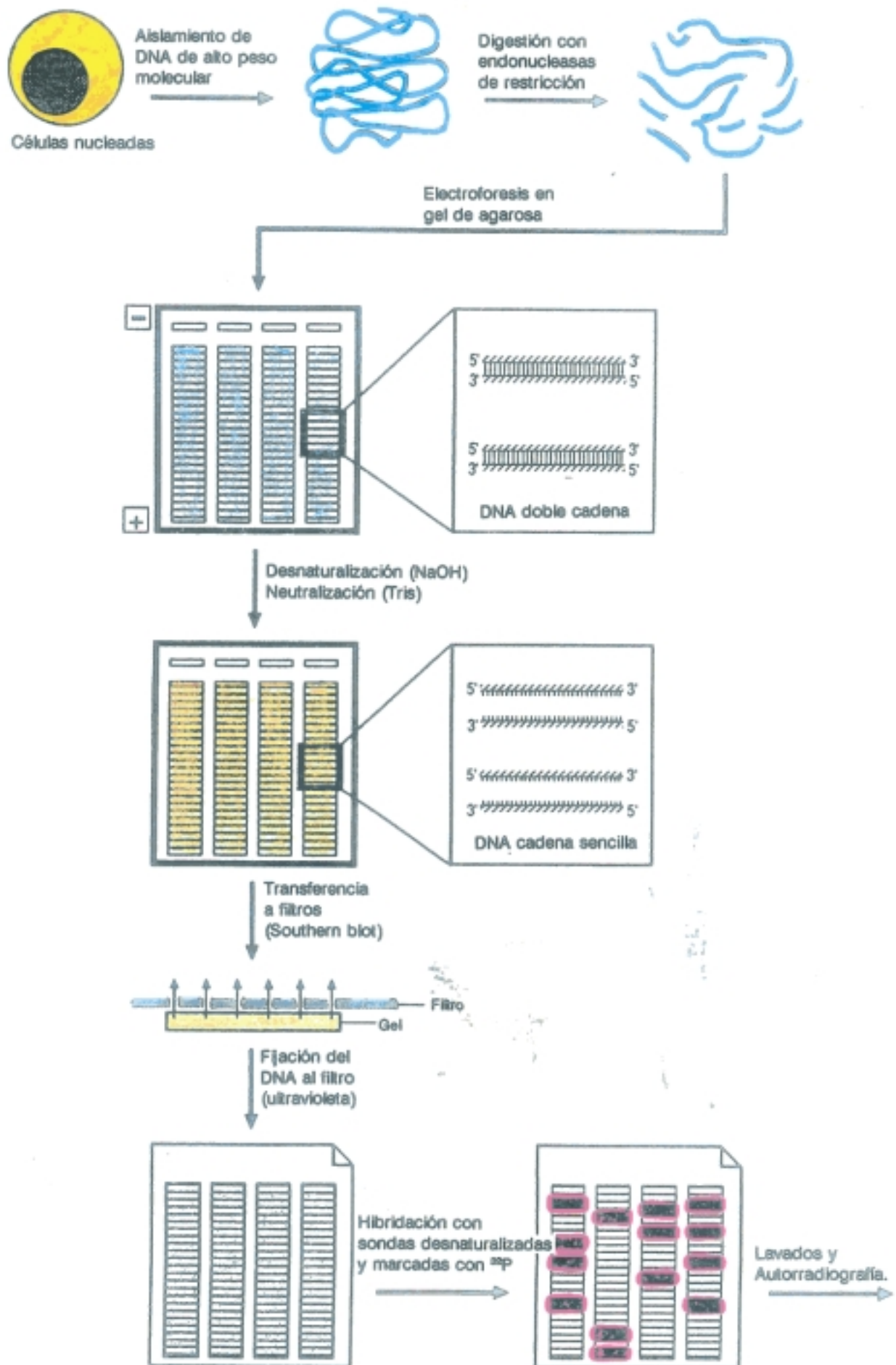


FIGURA 13. Esquema de la técnica de SOUTHERN BLOT.

EEUU) al 0.7 % en agua destilada con 6ml de TEA 50X. Se hirvió en un horno microondas hasta la total solubilización de la agarosa. Después, y antes de echar el gel en la bandeja de metacrilato, se añadieron 14 μ l de Bromuro de Etidio (10 mg/ml; concentración final 0.5 mg/ml). Cuando el gel alcanzó 56 °C se vertió sobre una bandeja de metacrilato (BRL, EEUU) en una placa niveladora, dejándolo gelificar en horizontalidad durante al menos 30 minutos, tomando un aspecto opaco. Pasado este tiempo, se quitó el peine formador de pocillos, y se introduce en el tanque de electroforesis (BRL, EEUU) que contenía dos litros de tampón TEA 1X pH 8.0 y 100 μ l de Br de Etidio. El gel debe quedar completamente sumergido por el tampón.

Con el gel preparado, se tomó 1 μ g del DNA digerido, guardando el resto en hielo, hasta comprobación de la digestión en el control. Este volumen de DNA se añade a 4 μ l de solución de BPB 5X y la cantidad necesaria de agua destilada hasta 20 μ l. Se procedió luego al llenado de los pocillos, evitando la formación de burbujas. Se situaron en los extremos marcadores de peso molecular (fago lambda digerido con Hind III; Boeringher Mannheim, Alemania). Se cargaron 10 μ l de fago lambda, 4 μ l de tampón de BPB y agua hasta 20 μ l.

Se realizó la **electroforesis**, a 4V/cm² durante 2 horas. Al cabo de las 2 horas, se saca la bandeja del gel fuera del tanque de electroforesis, y se llevó a un transiluminador para visualizar el DNA, ya que la luz ultravioleta (302 nm) excita el bromuro de Etidio intercalado entre las bases del DNA. Finalmente se tomó una fotografía del gel que se archivó para su estudio (Polaroid, EEUU)

En una digestión correcta, aparece una mancha continua desde el pocillo, debido a que se han formado una gran cantidad de fragmentos de diferentes tamaños y cuya migración difiere según el peso molecular (Figura 14). En algunas ocasiones, puede aparecer el DNA hacia un extremo más alejado del pocillo. Esto podría ser debido a una sobredigestión ó bien a una mala conservación de la muestra.

2.2.3. Electroforesis en geles de agarosa

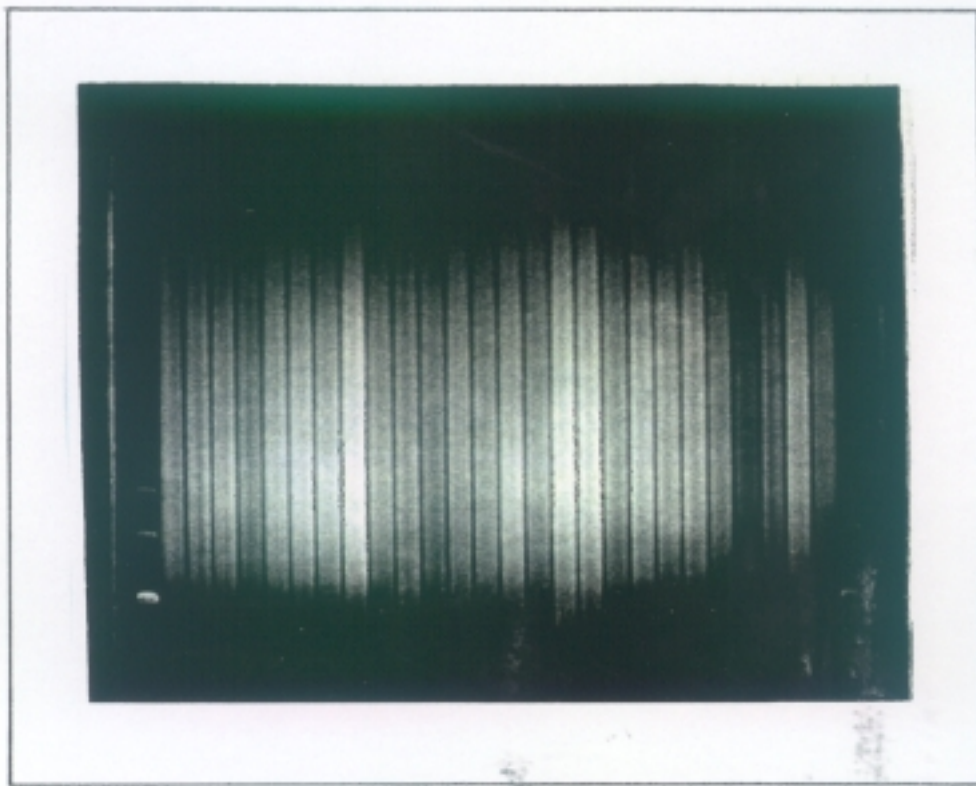


FIGURA 14. Electroforesis en agarosa de la digestión de ADN genómico con la enzima de restricción Taq I.

La electroforesis en geles de agarosa tiene como objeto la separación de fragmentos de DNA en función de su tamaño molecular. La distancia a la que migran estos fragmentos en el gel varía inversamente proporcional con el logaritmo del peso molecular.

Una vez comprobada la digestión, se realizó la electroforesis del resto del digerido. Se preparó un gel de 0.7 % de agarosa de 20 cm x 25 cm x 0.6 cm. El gel, se introdujo en el tanque de electroforesis con dos litros de tampón TEA 1X y Br Et 0.5 mg/ml.

Se cargaron en los pocillos 9 μ g de DNA con 4 μ l de solución BPB 5X y agua destilada hasta 20 μ l . Como marcadores de peso molecular se utilizaron dos muestras de fago lambda digerido con Hind III en los extremos del gel.

Se realiza después la electroforesis y las muestras se someten a 2V/cm 2 durante 56 horas, haciendo recircular el tampón de electroforesis con una bomba peristáltica (Pharmacia, Suecia) que se conecta inmediatamente después que las muestras han salido del pocillo y han entrado en el gel. El voltaje en un principio es de 30V y después se fija a 40V.

Cuando la electroforesis hubo concluido, se tomó una fotografía en el transiluminador que se archiva para estudio.

2.2.4. Transferencia a filtros de nylon. (Southern blot).

Esta técnica (**Southern Blotting**, Southern, 1975) es utilizada para transferir el DNA desde su posición en un gel de agarosa a un filtro de nitrocelulosa o nylon situado encima del gel. El DNA se desnaturaliza, neutraliza y transfiere por medio de capilaridad con un tampón de alta concentración salina. El DNA desnaturalizado, monocatenario se une al filtro de una forma permanente, para posteriormente hibridarlo con una sonda radiactiva.

Se cortó el gel a la altura de los pocillos. A temperatura ambiente, se lava el gel con 400 ml de HCl 0.15 M, durante 10 minutos y posteriormente se lava con agua

destilada para eliminar el exceso de ácido. Luego se introduce el gel en 400 ml de solución de NaOH 0.2M/NaCl 0.6M durante 30 minutos. Retirar el líquido y lavar con agua. Sumergir el gel en Tris pH 7.6 0.5M/NaCl 1.5M durante 30 minutos. Pasado este tiempo, se lava con buffer de transferencia, durante al menos cinco minutos. La membrana de nylon (Hybond, Amersham, Reino Unido) se introduce en agua destilada antes de ser utilizada.

El sistema de transferencia incluye, desde la base hasta la parte superior, (Figura 15):

- * Una batea con 500 ml de buffer fosfatos.
- * Un soporte de plexiglás atravesado sobre la batea.
- * Una capa de papel Whatman 3MM (Whatman, USA) mojada con tampón de transferencia y con los extremos dentro de la batea, evitando la formación de burbujas
- * El gel, tratado como se ha descrito.
- * La membrana de nylon previamente humedecida
- * Dos capas de papel Whatman 3 MM humedecidos en buffer de electroforesis
- * 10 cm de toallas de papel de filtro
- * Una placa de vidrio
- * 0.5 Kg de peso

Después de unas 18 horas se cambiaron las capas húmedas de toallas de papel por nuevas capas secas. Se dejó que la transferencia se produjera durante 18 horas, con el volumen suficiente de tampón de transferencia. Después de la transferencia se eliminó cualquier posible resto de agarosa, lavando la membrana durante 5 ó 10 minutos en SSPE 2X. Una vez lavada se dejó secar a temperatura ambiente en papel de filtro Whatman 3MM. Se controló con la lámpara ultravioleta la adecuada transferencia del DNA del gel a la membrana de nylon.

La membrana se mantuvo en una bolsa de plástico sellada con líquido de prehibridación a 4 °C antes de utilizarla.

2.2.5. Marcaje radiactivo de las sondas (Random priming)

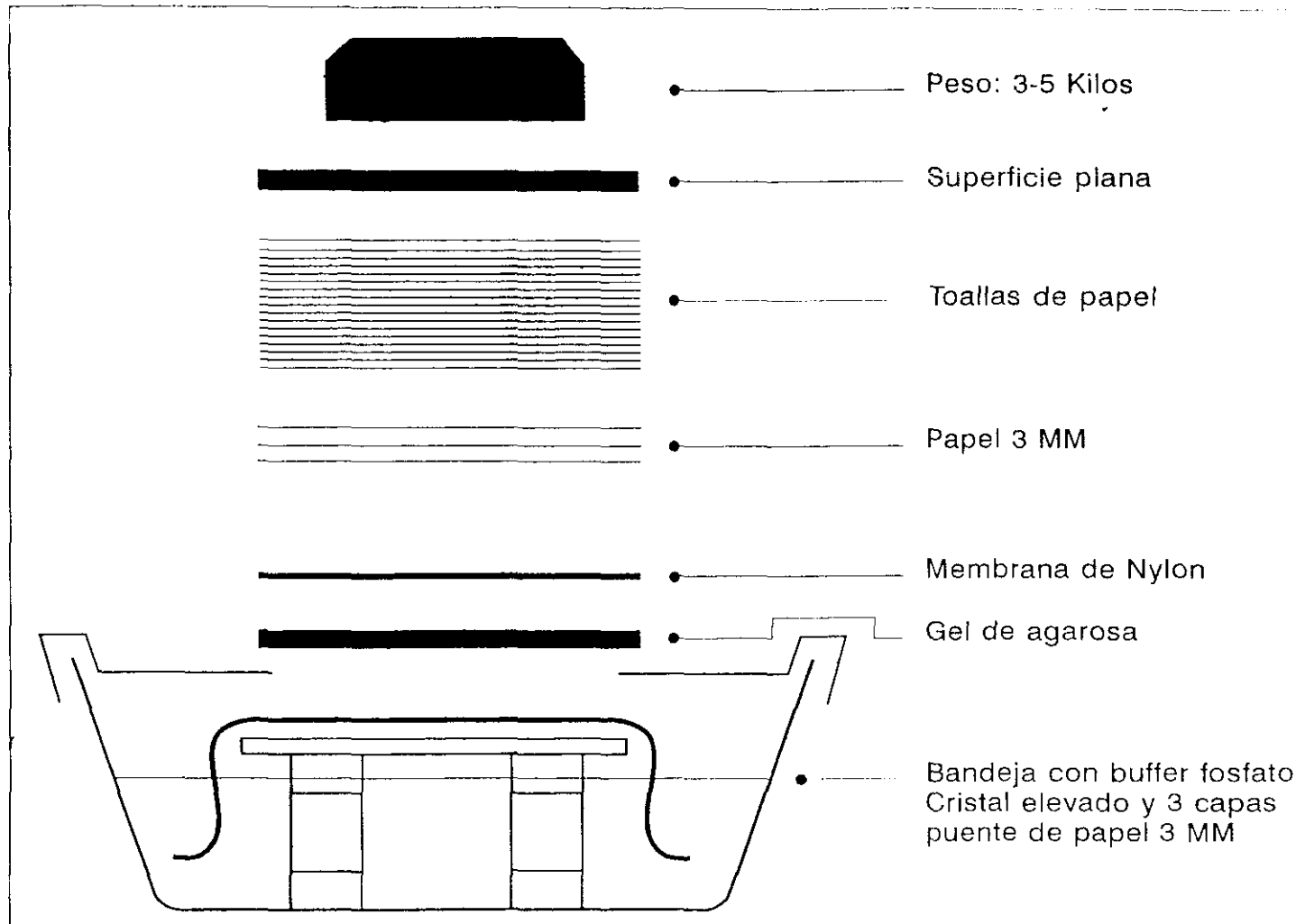


FIGURA 15. Esquema de la fase de transferencia de ADN desde el gel a la membrana de nitrocelulosa en la técnica de Southern blot.

Previamente a su inclusión en la reacción de hibridación, la sonda fue marcada radiactivamente por el método de "Random priming" (Feinberg y Vogelstein, 1983). Se mezclaron 25 ng de la sonda (5 µl) a utilizar con 250 pg de DNA de fago Lambda Hind III, y se hirvió durante 2 minutos y posteriormente se introdujo en hielo 5 minutos. A continuación se añadieron 5 µl de solución OLB 5X, 4 µl de dCT³²P a 10 µCi/µl (>3000 Ci/mM) (Amersham, Reino Unido) y 4 unidades de DNA polimerasa I (fragmento Klenow), y se llevó a un volumen final de 25 µl con agua destilada. El marcaje duró de 3 a 18 horas. Una vez terminado, los nucleótidos no incorporados se eliminaron mediante cromatografía de penetrabilidad a través de una columna de 9 ml de Shephadex G 200 (Pharmacia Suecia). La actividad específica de la sonda marcada se determinó mediante el conteo de radiactividad en un contador de centelleo líquido (LKB, Suecia) de una fracción alícuota de 2 µl de la solución obtenida.

2.2.6. Hibridación en filtros de nylon.

Este es un procedimiento para hibridar una sonda de DNA marcada radiactivamente con ³²P con los fragmentos de DNA separados en un gel de agarosa y luego transferidos a un filtro de nitrocelulosa o nylon.

La hibridación consta de dos fases: prehibridación y la hibridación propiamente dicha.

Se introduce la membrana en una bolsa de plástico con 30 ml de mezcla de **prehibridación**. Se sella y se deja 18 horas a 42 °C con agitación en un baño termostático. Transcurrido este tiempo la mezcla de prehibridación se sustituye por 20 ml de mezcla de **hibridación**. La bolsa se sella de nuevo y se vuelve a incubar 40 h a temperatura constante de 42 °C con agitación en el mismo baño.

Una vez terminado el proceso de hibridación se extrajo la membrana de la bolsa y se realizaron una serie de lavados para la eliminación del sobrante de sonda no hibridada con el DNA de la membrana. Estos fueron los siguientes: a) dos veces con una solución SSPE 2X durante cinco mn cada vez, a temperatura ambiente; b) una vez, con

una solución SSPE 2X, 0.5% SDS durante 15 mn a 65 °C y c) una vez, con una solución SSPE 0.5X durante 15 mn a 65 °C.

2.2.7. Exposición y revelado.

Una vez realizados los lavados anteriormente señalados, la membrana se dejó secar al aire, sobre una hoja de papel Whatman y fue expuesto a películas radiográficas X-OMAT-AR (Kodak, EEUU) entre dos pantallas intensificadoras, durante 18 horas a -80 °C. Al día siguiente se reveló una de las películas y se dejó exponiéndose la otra durante un tiempo más largo (De 1 a 10 días), dependiendo de los resultados de la primera exposición. Las autoradiografías se archivaron para su análisis posterior.

2.2.8. Deshibridación.

Después de los pasos anteriores la membrana se deshibrida, eliminando así la sonda radiactiva de modo que quede apta para una posterior hibridación con una nueva sonda.

Para la deshibridación, se lavó la membrana 30 mn con una solución de NaOH 0.2 M y posteriormente 30 mn más con una solución de Tris 0.2 M pH 7.5, SDS 0.5% a 42 °C y con agitación enérgica.

La deshibridación se confirmó mediante una autoradiografía durante 18 horas a - 80 °C. Después se guarda la membrana con mezcla de prehibridación, en una bolsa sellada a 4 °C, hasta nuevo uso.

2.3. Interpretación de los patrones de RFLP de los loci DRB, DQA, DQB (clase II) y C4 (clase III).

2.3.1. Patrones de RFLP DRB/Taq I.

La sonda utilizada (pRTV1, ver apartado 2.1.4.) con la endonucleasa

de restricción Taq I identificó 24 RFLPs. Distintas combinaciones de ellos dieron lugar a una serie de patrones que correlacionan con las especificidades serológicas HLA descritas. En la figura 16 se muestra un ejemplo de los patrones obtenidos. De esta forma cada uno de los antígenos HLA-DR se define, por genética molecular (DNA-RFLP), por un grupo de RFLP (Figura 16):

DR1 y DRB = 6.1 Kb + 4.4 Kb;
DR15 (DR2) = 12.5 Kb + 1.6 Kb + 1.3 Kb;
DR16 (DR2) = 14.8 Kb + 1.5 Kb + 1.45 Kb;
DR17.1 (DR3) = 11.1 Kb + 7.8 Kb + 4.20 Kb;
DR17.2 (DR3) = 13.0 Kb + 7.8 Kb + 4.15 Kb;
DR18 (DR3) = 11.1 Kb + 6.5 Kb + 4.1 Kb;
DR4 = 14.8 Kb + 6.1 Kb + 5.4 Kb + 3.8 Kb;
DR11 (DR5) = 13.0 Kb + 6.5 Kb + 4.2 Kb;
DR12 (DR5) = 13.0 Kb + 4.2 Kb + 4.10 Kb;
DR13a1 (DR6) = 11.1 Kb + 7.8 Kb + 4.10 Kb;
DR13a3 (DR6) = 11.1 Kb + 7.8 Kb + 4.3 Kb;
DR13a4 (DR6) = 13.0 Kb + 7.8 Kb + 4.2 Kb;
DR13b (DR6) = 11.1 Kb + 6.5 Kb + 4.1 Kb;
DR14a (DR6) = 13.0 Kb + 7.8 Kb + 4.2 Kb
DR14b (DR6) = 11.1 Kb + 7.8 Kb + 4.10 Kb;
DR7.1 = 14.8 Kb + 7.9 Kb + 4.1 Kb + 2.6;
DR7.2 = 14.8 Kb + 6.1 Kb + 4.1 Kb + 2.7 Kb
DR8 = 9.6 Kb;
DR9 = 14.8 Kb + 6.1 Kb + 4.1 Kb + 2.7 Kb;
DR10 = 13.9 + 4.4 Kb.

Se ha encontrado otro RFLP poco frecuente que correlaciona con la especificidad serológica DR4, DRB 4x = 14.8 Kb + 7.9 Kb + 5.4 Kb + 2.6 Kb

2.3.2. Patrones de RFLP DQA/Taq I.

DRB RFLP

	1 Br	15	16	17 ¹	17 ²	4	11	12	13a 14b	13a	13a 14a	13b 18	7 ¹	7 ²	8	9	10
<u>Kb</u>																	
14,8		-				-							-	-			-
13,9																	-
13,0					-		-	-			-						
12,5		-															
11,1				-					-	-		-					
9,6																	
7,9													-				
7,8				-	-				-	-	-						
6,5							-					-					
6,1	-					-								-			-
5,4						-											
4,4	-																
4,3																	
4,2				-	-		-	-				-					
4,1								(-)	-			-	-	-			-
2,7						-								-			-
2,6													-				
1,6		-															
1,5			-														
1,45			-														
1,3		-															

FIGURA 16. Patrones de hibridación (RFLP) generados con la digestión con Taq I y la sonda de cDNA pRTV1.

La sonda utilizada (pDCH1, ver apartado 2.1.4.) con la endonucleasa de restricción Taq I identificó 7 RFLP, dos de los cuales pertenecían al gen DQA2 (alelos U/L, Bidwell et al, 1987). Cada uno de ellos correlacionó con las especificidades serológicas descritas. De esta forma, cada uno de los antígenos HLA-DQ se define, por genética molecular (DNA-RFLP) por un grupo de RFLPs (Figura 17):

DQ α 1a (DQ1) = 2.7 Kb;

DQ α 1b (DQ1/DQ4) = 6.7 Kb;

DQ α 1c (DQ1) = 7.4 Kb;

DQ α 2 (DQ2/DQ7) = 4.8 Kb;

DQ α 3 (DQ2/DQ3) = 5.8 Kb.

DQ α 4 (DQ4) = 6.4 Kb

DQ α 3b (DQ3, DR11-DQ3) = 4.9 Kb

Las bandas de las especificidades DQ α 4 y DQ α 3b sólo pueden diferenciarse respectivamente de DQDQ α 1b y DQ α 2 cuando la electroforesis es de larga duración (Apdo 2.2.3.). Además de los RFLPs específicos de DQA1 se pueden definir 2 RFLPs asociados al gen DQA2, que también hibrida con la sonda pDCH1:

DQA2 U = 2.1 Kb

DQA2 L = 2.0 Kb

2.3.3. Patrones de RFLP DQB/Taq I.

La sonda utilizada (pII- β -1, ver apartado 2.1.4) con la enzima de restricción Taq I identificó 11 RFLP. Combinaciones de ellos dieron una serie de patrones que correlacionaron con las especificidades serológicas descritas. De esta manera, cada uno de los antígenos HLA DQ se define, por genética molecular (DNA-RFLP), por un grupo de RFLP, (Figura 17):

DQ β 1a (DQ1) = 5.5 Kb + 4.5 Kb;

DQ β 1b (DQ1) = 4.5 Kb + 2.8 Kb;

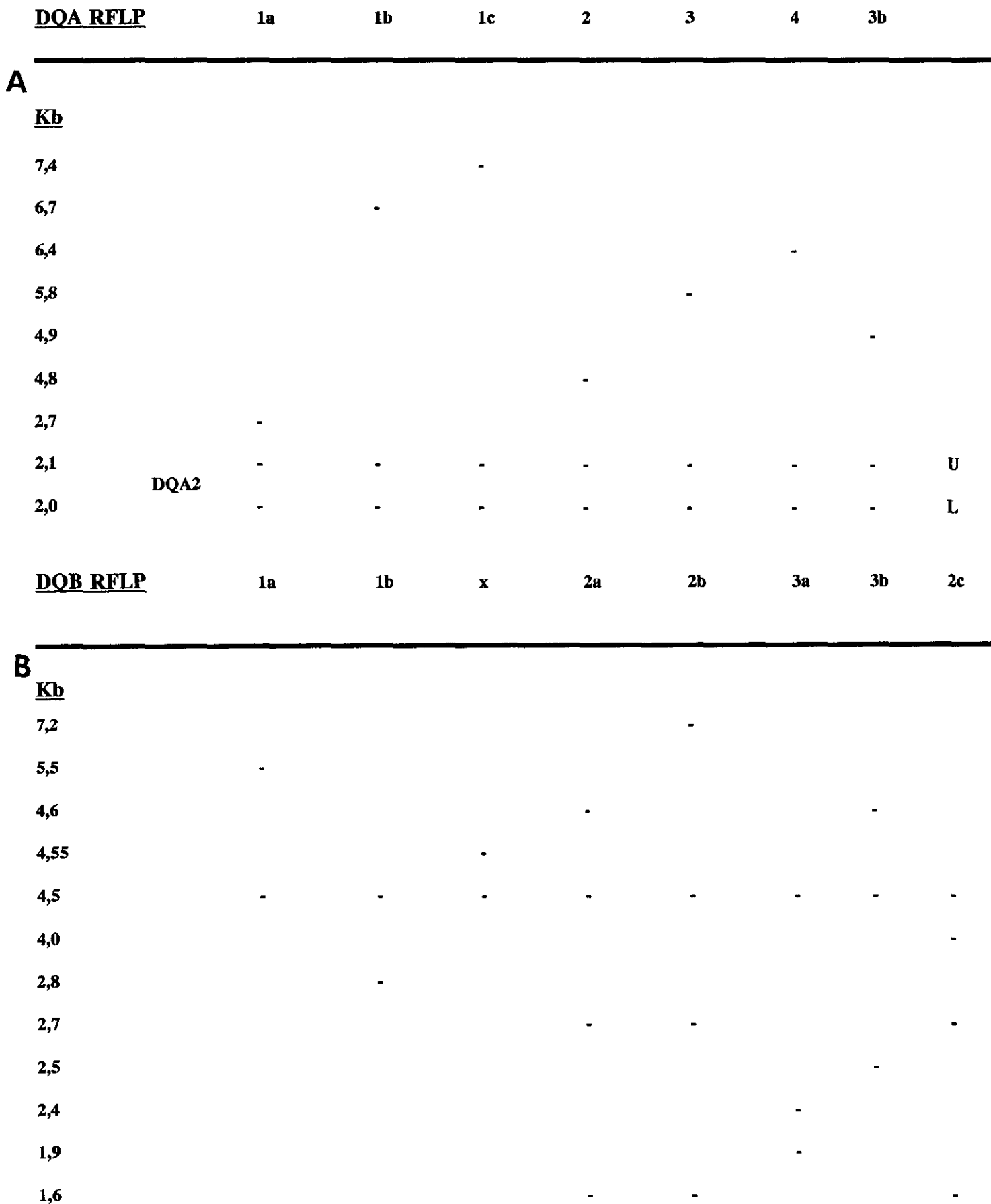


FIGURA 17. Patrones de hibridación (RFLP) generados con la digestión con Taq I y las sondas: **A)** pDCH1. RFLP de HLA-DQA y **B)** pII- β -1. RFLP de HLA-DQB.

$DQ\beta \times (DQ1) = 4.55 \text{ Kb} + 4.5 \text{ Kb}$
 $DQ\beta \text{ 2a (DQ2)} = 4.6 \text{ Kb} + 4.5 \text{ Kb} + 2.7 \text{ Kb} + 1.6 \text{ Kb};$
 $DQ\beta \text{ 2b (DQ2)} = 7.2 \text{ Kb} + 4.5 \text{ Kb} + 2.7 \text{ Kb} + 1.6 \text{ Kb};$
 $DQ\beta \text{ 2c (DQ2)} = 4.5 \text{ Kb} + 4.0 \text{ Kb} + 2.7 \text{ Kb} + 1.6 \text{ Kb};$
 $DQ\beta \text{ 3a (DQ8/DQ4)} = 4.5 \text{ Kb} + 2.4 \text{ Kb} + 1.9 \text{ Kb};$
 $DQ\beta \text{ 3b (DQ7)} = 4.6 \text{ Kb} + 4.5 \text{ Kb} + 2.5 \text{ Kb}.$

2.3.4. Patrones de RFLP C4 y 21-OH/Taq I.

Las sondas utilizadas (pAT-A (C4) y pC21a (21-OH), ver apartado 2.1.4.) con la endonucleasa de restricción Taq I dan lugar a unos patrones específicos del extremo 5' del locus C4 y su locus vecino P450c21. Ellos permiten definir el tamaño (presencia de el intrón de 6-7 Kb) y la organización de los genes C4 y detectar las deleciones y duplicaciones de estos genes (Schneider y col., 1986). Después de la hibridación con las respectivas sondas se pueden visualizar 4 fragmentos de restricción para C4 y dos fragmentos para 21-OH:

- Un fragmento de 7 Kb específico de locus C4A.
- Un fragmento de 6.4 Kb, marcador de la deleción del gen C4 en el complotipo SC01(BF*S C2*C C4A*Q0 C4B*1). Este complotipo normalmente forma parte del haplotipo extendido HLA-B8, DR3, SC01.
- Un fragmento de 6 Kb que representa la forma del C4B " long".
- Un fragmento de 5.4 Kb que representa la forma del C4B " short".
- Los genes 21-OH se identifican respectivamente con las bandas de 3.2 Kb (21-OH) y 3.7 Kb (21OHB).

En la figura 18 se representa un mapa de los genes C4 y P450c21(21-OH) donde se muestran los RFLPs característicos utilizando Taq I y las sondas específicas citadas anteriormente.

Las deleciones y duplicaciones en el locus C4B y 21-OH A se determinan comparando las intensidades de las bandas específicas obtenidas. En la figura se muestran las combinaciones de los distintos fenotipos C4 y 21-OH encontrados en los individuos

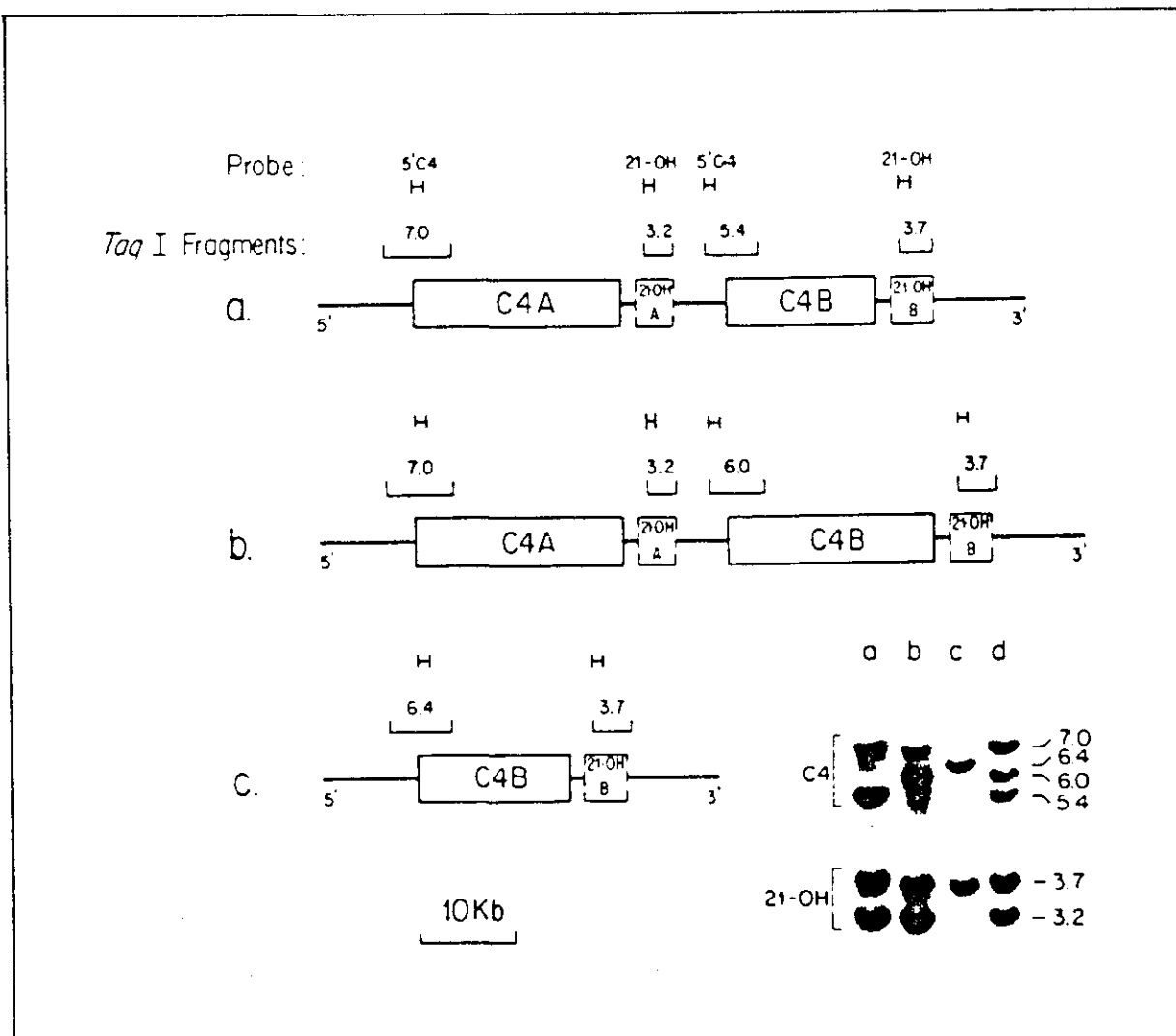


FIGURA 18. Mapa de los genes de C4 y 21-hydroxylasa, donde se muestran el patrón de restricción de la enzima Taq I a) Los fragmentos 7.0 /5.4 Kb indican la presencia de un gen de C4A en combinación con C4B "short". b) Los fragmentos 7.0/6.0 Kb, un gen C4A en combinación con un C4B "long". c) el fragmento de 6.4 Kb, una delección de C4A y 21-OHA en combinación con un C4B "short". d) y los fragmentos 7.0/6.0/ y 5.4 kb representan un patrón heterocigoto en C4B: un C4B "short y uno "long". Tomado de Schneider y col, 1986.

estudiados.

3. ASIGNACION DE SECUENCIAS DEL EXON 2 DE DQA1 Y DQB1 A PARTIR DE LOS RFLPs DE HLA-DQ.

Los RFLP de DQA1 y DQB1 han sido asignados a las especificidades Dw definidas por técnicas de cultivo celulares (Bidwell,1988; Martinez Laso et al 1989 a; Martinez Laso et al 1989b, que a su vez, se han asociado a las secuencias del exón 2 de DQA1 y DQB1 (Marsh et al,1989) (Tabla 6).

Fue posible por tanto, asignar de una forma inequívoca los aminoácidos de la cadenas proteicas codificadas por los genes DQA1 y DQB1, y valorar así la influencia de los diferentes residuos en la susceptibilidad a la enfermedad y en la producción de autoanticuerpos en el LES.

Así, por ejemplo, DR15 puede asociarse a dos fenotipos Dw diferentes, Dw2 y Dw12. El DR15-Dw12 se corresponde con el alelo de DNA-RFLP DQ6-DQ α 1b-DQ β 1b, que, a su vez, tiene la secuencia del exón 2 de DQ: DQA1*0102-DQB1*0602. Por otra parte, DRw15-Dw12 se corresponde con el alelo de DNA-RFLP DQ6-DQ α 1c-DQ β x, cuya secuencias del exón 2 de DQ corresponden a DQA1*0103 y DQB1* 0601.

4. DETERMINACION DE ANTICUERPOS ANTI-NUCLEARES EN SUERO.

Los anticuerpos anti-nucleares (ANA) constituyen uno de los rasgos serológicos más comunes y característicos de las enfermedades reumáticas autoinmunes, especialmente en el LES donde los ANA constituyen en sí mismos uno de los once criterios útiles en el diagnóstico de la enfermedad (Tan y col., 1982). En esta enfermedad aparecen frecuentemente ANA de alto título con una gran diversidad de patrones y especificidades.

4.1. Inmunofluorescencia Indirecta (IFI). Determinación de ANA y anti DNA de doble cadena.

Alogenotopos de DRB1	Alogenotopos DQ		Secuencias del exón 2	DQA1	DQB1
	DQA1	DQB1	Dw asociado		
DR1,Br,10	1a	1a	1,20,BON	0101	0501
DR14	1a	1a	9	0101	0503
DR15	1b	1b	2	0102	0602
DR15	1c	x	12	0103	0601
DR16	1b	1a	21	0102	0502
DR17.1,17.2	2	2a	3,3var.	0501	0201
DR4	3	3a	4,2,10,13B,14A,15	0301	0302
DR4	3	3b	4,1,13A	0301	0301
DR11,12,13b	3b	3b	5,DB6,HAG	0501	0301
DR13a1,13a2,13a4	1c	1b	18	0103	0603
DR13a3	1b	1a	19	0102	0604
DR7.1,7.2a	3	2b	7,17	0201	0201
DR7.2b, 9	3	3a	11,23	0301	0303
DR8	4	3a	8.1	0401	0402

TABLA 6. Correlación entre alogenotopos DRB1, DQA1, DQB1, especificidades Dw y secuencias del exón 2 de HLA-DQA y DQB.

La técnica de inmunofluorescencia indirecta es una técnica histoquímica para la detección de antígenos. Es un ensayo de doble anticuerpo donde se detecta la presencia de un anticuerpo (normalmente formando parte de un suero) unido a un sustrato mediante la utilización de otro anticuerpo conjugado con un compuesto fluoresceinado, normalmente isotiocianato de fluoresceína).

Esta técnicas se han utilizado ampliamente durante unos años para la realización del test más sencillo para la detección de los ANA. Los tejidos utilizados como sustratos son hígado, estómago y riñón de rata y por otra parte la línea celular Hep-2 (Human epitelioid cell line). Esta última tiene la ventaja de poseer una mayor sensibilidad en la detección de algunas especificidades de ANAS.

La técnica de IFI para la detección de ANAs (Figura 19) puede resumirse en los siguientes pasos:

- 1.- Obtención de secciones de tejidos de rata de 6 micras de grosor, o células Hep-2 . Ambas se permeabilizan con un disolvente orgánico previamente a:
- 2.- Incubación con el suero del paciente autoinmune diluido 1/40 en PBS.
- 3.- Lavado con PBS para eliminar el exceso de anticuerpo específico en suero.
- 4.- Incubación con el conjugado fluoresceinado anti-inmunoglobulinas humanas.
- 5.- Lavado, montaje del cubre con medio de montaje y
- 6.- Lectura en microscopio de fluorescencia de luz UV (E0 495nm, Nikon) donde la excitación de compuesto fluoresceinado emite a baja energía en el espectro visible en color verde.

También se utiliza esta técnica para la detección de los autoanticuerpos anti-DNA de doble cadena o nativo (ds-DNA). El sustrato utilizado en este caso es el protozoo *Crithidia Lucillae* cuyo kinetoplasto (o cinetónúcleo) contiene una gran concentración de ds-DNA.

El último paso de este test consiste en titular el suero positivo, lo cual se realiza mediante una dilución seriada del suero en PBS (1/40, 1/80, etc para los ANA y 1/2, 1/4....etc

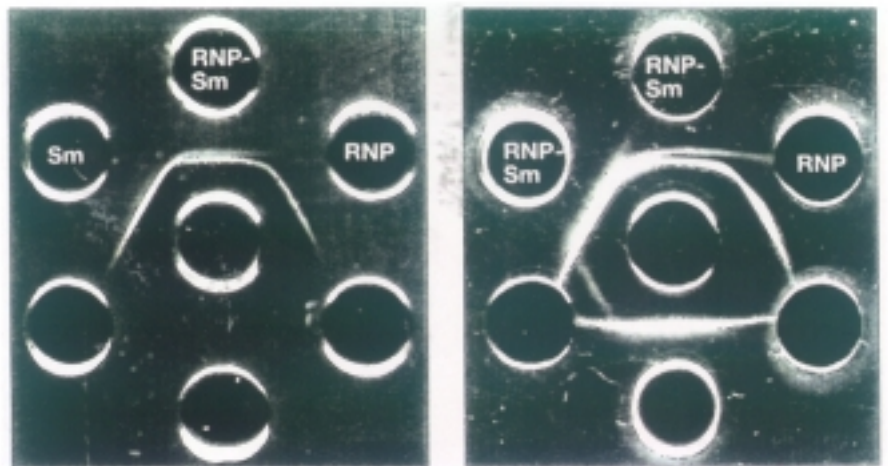
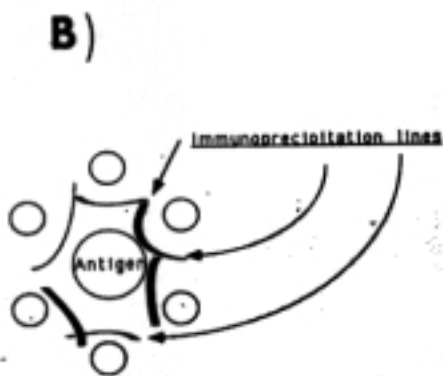
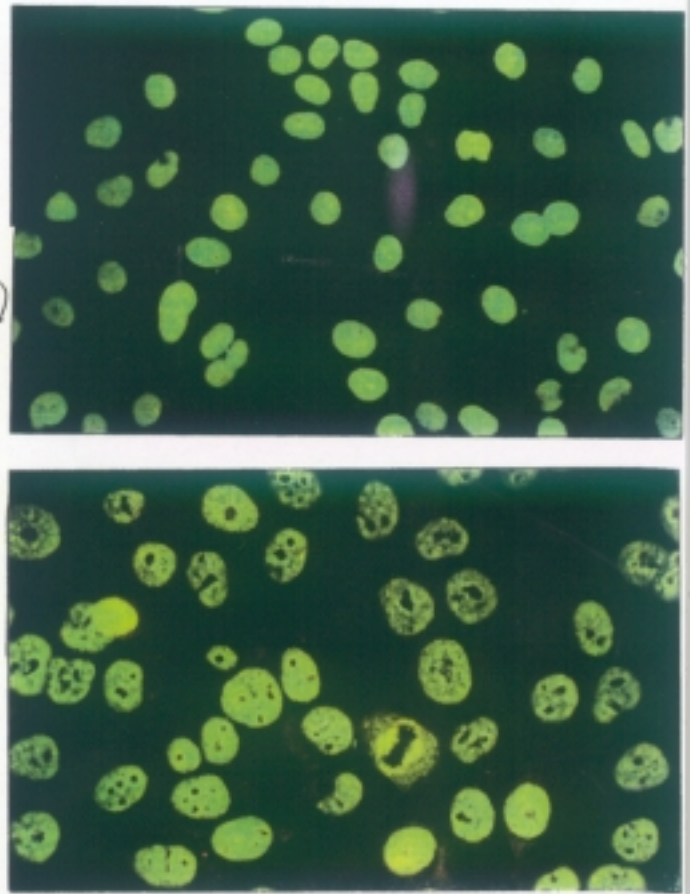
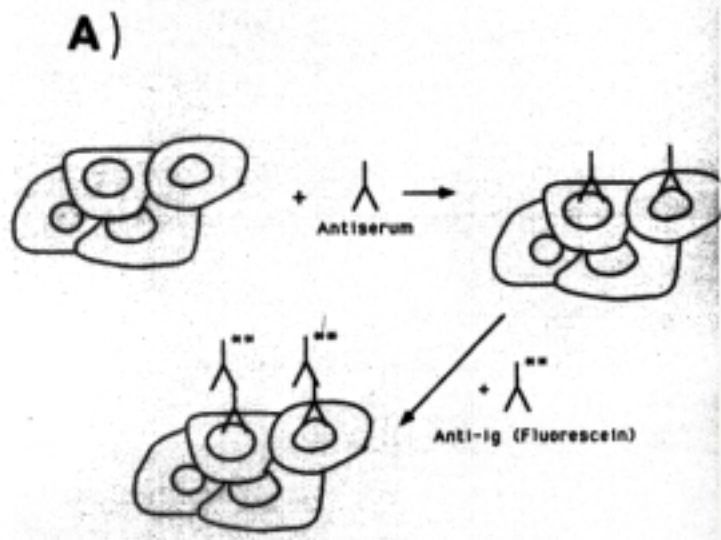


FIGURA 19. Esquema e ilustración de las técnicas de detección de Anticuerpos anti nucleares. **A)** Inmunofluorescencia indirecta (IFI), para la determinación de ANA. Patrón ANA moteado y homogéneo en células Hep-2 **B)** Inmunodifusión de Ouchterlony. Se muestran los arcos de precipitación de los sueros de especificidades ENA (Extractable nuclear antigens) RNP y Sm.

para los anti-DNAs) y elección de la última dilución positiva en el test de IFI.

La IFI no aporta información respecto a la identidad específica de los antígenos reconocidos por los sueros autoinmunes. Aunque los patrones de tinción de las células (homogéneo, nucleolar periférico, moteado, centromérico etc) pueden sugerir en algunos casos la presencia de una especificidad característica.

4.2. Determinación de anticuerpos anti-Antígenos antinucleares extraíbles del núcleo (ENA).

Aunque se han descrito correlaciones clínicas basadas en la presencia de ANA o en los patrones de tinción de fluorescencia, hoy se utilizan otras técnicas para complementar la IFI, como la determinación de los ENA.

Los ENA se han denominado clásicamente así por ser antígenos nucleares que tienen la propiedad de ser fácilmente **extraíbles del núcleo** celular cuando se realizan los lavados convencionales de los tejidos utilizados como sustratos con PBS. Se pueden determinar por tres técnicas fundamentalmente:

- * Contrainmunolectroforesis (CIE).
- * Inmunodifusión doble (ID) o inmunodifusión de Ouchterlony.
- * Inmunoprecipitación e Inmunoblotting

4.2.1. Determinación de ENA por CIE o ID .

Ambas se realizan en geles de agarosa donde se detectan los precipitados de antígeno-anticuerpo que se forman en el gel de un tamaño de poro adecuado. La CIE difiere de la inmunodifusión doble en que en el primer caso el campo eléctrico aplicado facilita la velocidad del proceso de precipitación (Figura 19).

Los extractos antigénicos utilizados son dos fundamentalmente:

1. Extracto nuclear de timo de conejo (Pel-freez Biol. Rogers, Arkansas)
2. Extracto de placenta (enriquecido con antígenos citoplasmáticos)

Estos extractos se preparan en el laboratorio a partir de un liofilizado de timo de conejo comercial y de una placenta humana recién alumbrada respectivamente, según protocolos detallados en el apartado 7 de pacientes y métodos.

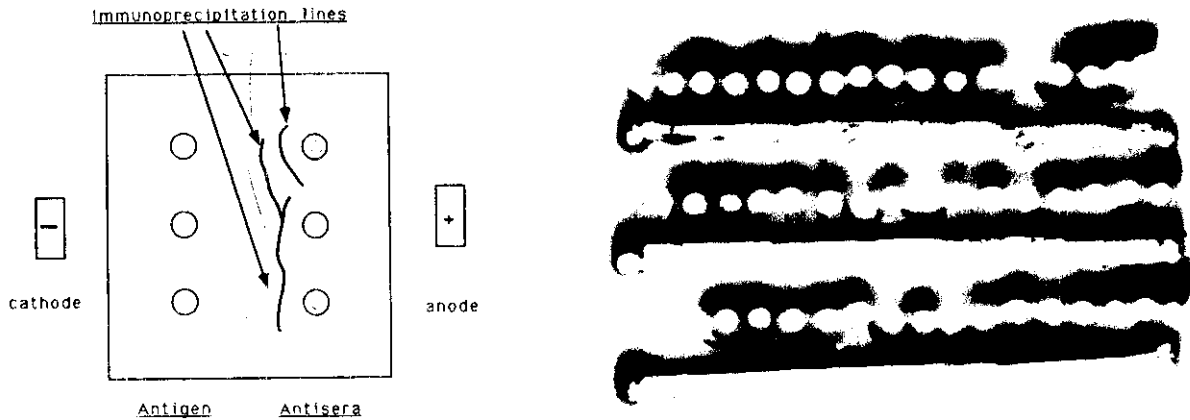
Se utilizan sueros control monoespecíficos para la determinación de las reacciones de identidad, identidad parcial y no identidad con los sueros problema. (Figura 19). Algunas de las especificidades de ENA más comunes y directamente relacionadas con el LES son: RNP, Sm, SSa (Ro), SSb(La), PCNA. Las técnicas anteriores presentan problemas de baja sensibilidad debida fundamentalmente a la falta de algunos antígenos en los extractos antigénicos. Por ello se ha completado el estudio de los ENA por la técnica de inmunoblotting.

4.2.2. Determinación de ENA por inmunoblotting.

La técnica consiste en una primera separación por electroforesis en poliacrilamida de las proteínas que componen el extracto antigénico nuclear de una línea celular (Hep-2 ó FLC) y después se realiza una transferencia a papel de nitrocelulosa sobre el que se incuban los sueros. El revelado se realiza con un antisuero marcado con peroxidasa y el revelado con una reacción colorimétrica (ANABLOT, biolab, Bélgica). De acuerdo con unos patrones establecidos podemos asignar las diferentes especificidades que se codifican por la aparición de bandas de diferente peso molecular (Figura 19)

Todos los sueros de los 58 pacientes del grupo estudiado se estudian, al menos dos veces durante el tiempo que dura el estudio, para la presencia de ANA por IFI; ENA por CIE e Inmunoblotting para una posterior confirmación sólo en el caso de los sueros positivos para ENA por CIE. Algunos de los sueros fueron más ampliamente estudiados para la presencia de ácidos ribonucleicos que se unen a las proteínas antigénicas que constituyen las especificidades ENA formando complejos. Se utilizó para ello una técnica de inmunoprecipitación de los ácidos nucleicos presentes en el extracto nuclear y

C)



D)

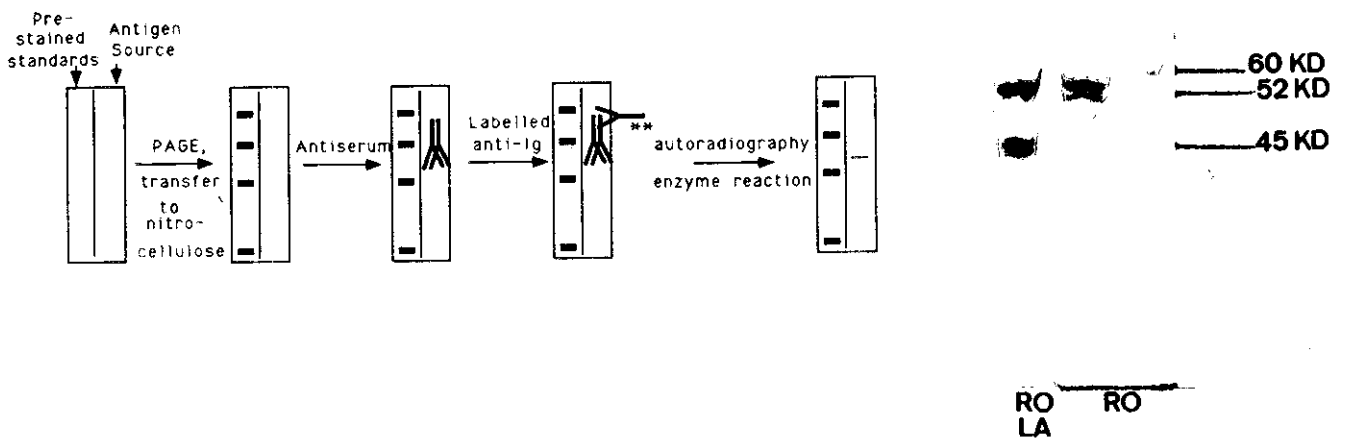


FIGURA 19(Cont.). Esquema e ilustración de las técnicas de detección de Anticuerpos anti nucleares. **C)** Contrainmuno-electroforesis (CIE) para la determinación de ENA. **D)** Immunoblotting , para la determinación de ENA. Esquema de la técnica y ejemplo de los patrones de las especificidades anti-Ro(60 Kd), anti Ro (60 +52 Kd) y anti Ro/La.

citoplasmático de células HELA con los anticuerpos presente en los sueros de los pacientes de LES. La técnica se detalla en Forman y col., 1985.

Los controles positivos utilizados para la identificación de los sueros problema se obtuvieron de enfermos afectos de diferentes conectivopatías. La especificidad de estos sueros había sido previamente determinada con sueros patrón cedidos por el CDC de Atlanta.

5. SELECCION DE INDIVIDUOS.

5.1. Sanos no relacionados:

El panel de controles sanos no relacionados está formado por 69 individuos, donantes voluntarios. En este grupo se determinaron los alelos serológicos HLA de clase I y II y los alelos DRB, DQA y DQB por técnicas de RFLP. También se determinan los alotipos del complemento C4 y Bf. El genotipo de C4 y de P450c21 (21-OH) sólo puede ser asignado en 52 de los 69 individuos sanos.

5.2. Pacientes afectos de LES y familias:

* Pacientes: Se estudiaron 58 afectos de LES no emparentados, diagnosticados según los criterios de la ARA (Tan et al, 1982).

* Familias: Este grupo esta formado por 10 familias en las que había al menos un individuo enfermo de LES. Podemos subdividir el grupo de familias en 3 subgrupos, según las características peculiares de cada uno. Estos grupos se muestran en las figuras 20, 21 y 22.

a/ Un grupo de 2 familias "multiplex" para LES, donde hay más de un individuo afecto de esta enfermedad.

b/ Un grupo de 3 familias donde existe un enfermo de LES y al menos otro individuo afecto de otra enfermedad autoinmune.

c/ Un grupo de 5 familias "simplex", con solo un enfermo de LES.

En el grupo de 58 enfermos se determinó el fenotipo HLA de clase I (HLA-A,-B y -C) y de clase II (-DR,-DQ) y el genotipo HLA DRB, DQA y DQB por técnica de RFLP. También los alotipos de C4 y Bf. Los genes de C4 y P450c21 solo pudieron ser determinados en 53 individuos de los 58 enfermos de LES.

Los individuos que componen las 10 familias fueron tipados para los antígenos de clase I y de clase II, bien por técnicas serológicas o de RFLP.

5.2.1 Clasificación de los pacientes de LES según aspectos clínicos.

Los enfermos y familias estudiados fueron seleccionados por el Dr Gomez Reino del servicio de Reumatología del Hospital 12 de Octubre de Madrid.

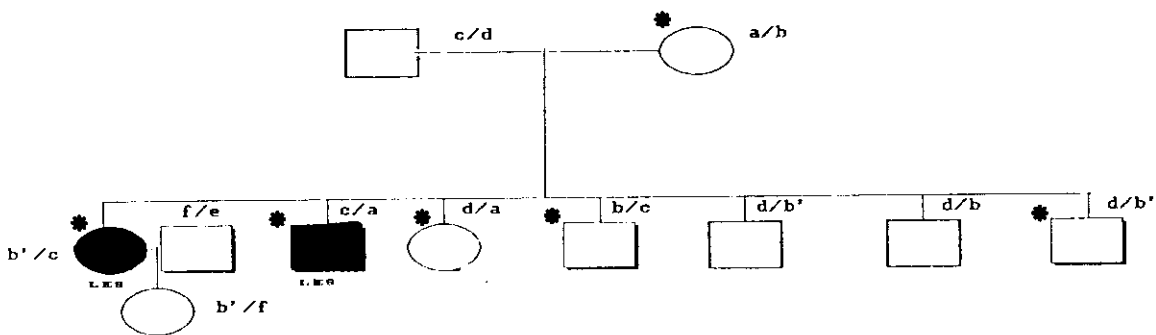
En los 58 pacientes se evaluaron las principales variables que se incluyen en el criterio (ACR criteria, Tan et al, 1982) de diagnóstico de la enfermedad. De esta manera los pacientes se examinaron para la presencia de artritis; artralgia; pleuritis; pericarditis; enfermedad neurológica; anemia y enfermedad renal.

En cuanto a la afectación renal, de los 58 pacientes analizados, 37 presentaron evidencia de clínica de daño renal y fueron biopsiados. Su nefritis pudo ser así clasificada de acuerdo con el criterio de la OMS modificado por Pirani y Pollack (Pirani y Pollack, 1978) en glomerulonefritis (GN) mesangial (MES); GN proliferativa focal (PF); GN membranosa (MEM) o GN proliferativa difusa (PD). El patrón y la severidad de cada tipo se relaciona directamente con la localización y la cantidad de inmunocomplejos depositados en el glomérulo renal .

La glomerulonefritis MES y PF son consideradas patologías de curso benigno mientras que la forma membranosa (MEM) puede evolucionar en ocasiones a importantes alteraciones en la función renal. La GNPD es la patología renal más severa en la entidad clínica del LES. El grupo de enfermos con GNPD constituye un grupo homogéneo

FAMILIA 1

- a/ A26 B8 Cw7 Bw6 DR3(17.1) DR52 DQ2
- b/ A24 B8 CWx Bw6 DR7(7.1) DR53 DQ2
- c/ A30 B18 Cw5 Bw6 DR3(17.2) DR52 DQ2
- d/ A23 B49 Cwx Bw4 DR8 DR52 DQ4
- b' (recombinante) A24 B8 Cwx Bw6 DR3(17.2) DR52 DQ2



FAMILIA 2

- a/ A24 B35 Cw4 Bw6 DR13 DR52 DQ1
- b/ A30 B18 Cw5 Bw6 DR3(17.2) DR52 DQ2
- c/ A24 B35 Cw4 Bw6 DR10 DR52 DQ1
- d/ A24 B45 Cwx Bw6 DR10 DR52 DQ1

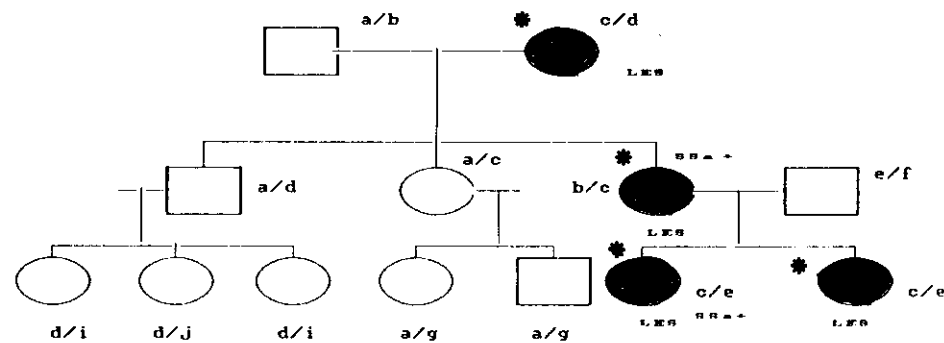


FIGURA 20. Arboles familiares, haplotipos HLA y principales características serológicas del grupo I de familias estudiadas. Familias MULTIPLEX, con más de un caso de LES. (*) ANA positivo

FAMILIA 1

- a/ A26 B8 Cw7 Bw6 DR3(17.1) DR52 DQ2
- b/ A24 B8 CWx Bw6 DR7(7.1) DR53 DQ2
- c/ A30 B18 Cw5 Bw6 DR3(17.2) DR52 DQ2
- d/ A23 B49 Cwx Bw4 DR8 DR52 DQ4
- b' (recombinante) A24 B8 Cwx Bw6 DR3(17.2) DR52 DQ2

FAMILIA 2

- a/ A24 B35 Cw4 Bw6 DR13 DR52 DQ1
- b/ A30 B18 Cw5 Bw6 DR3(17.2) DR52 DQ2
- c/ A24 B35 Cw4 Bw6 DR10 DR52 DQ1
- d/ A24 B45 Cwx Bw6 DR10 DR52 DQ1

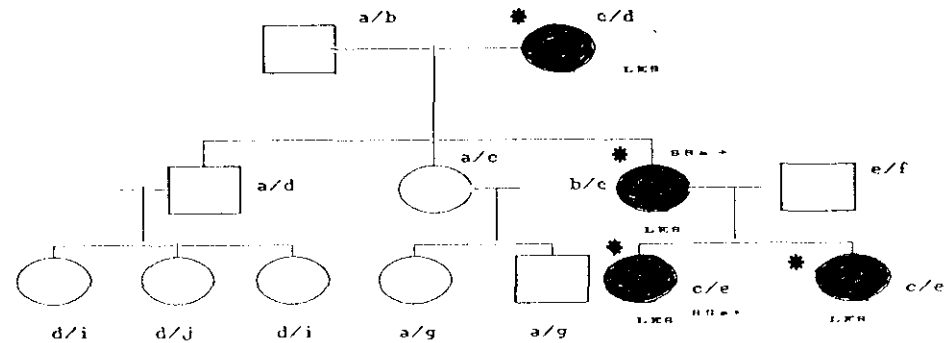
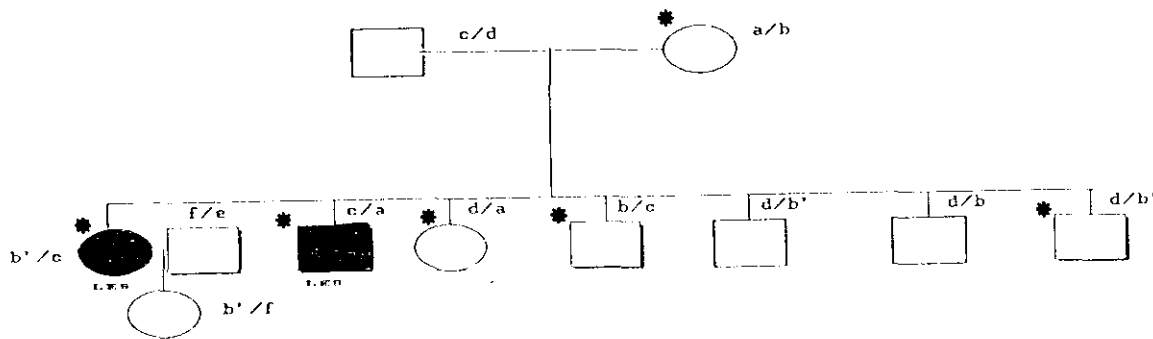
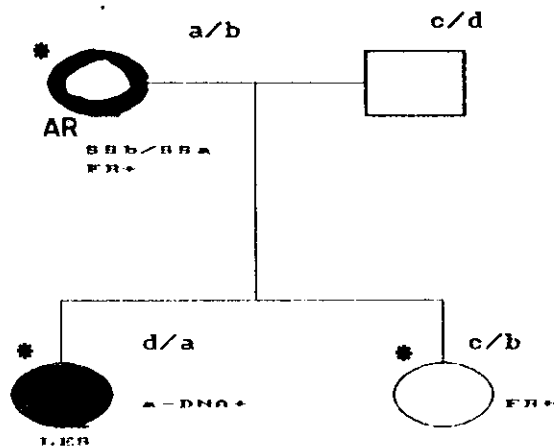


FIGURA 20. Arboles familiares, haplotipos HLA y principales características serológicas del grupo I de familias estudiadas. Familias MULTIPLEX, con más de un caso de LES.

FAMILIA 3

a/ A1 B18 Cw5 Bw6 DR3(17.2) DR52 DQ2
 b/ A1 B57 Cwx Bw4 DR7(7.2) DR53 DQ2
 c/ A2 B44 Cw4 DR7(7.1) DR53 DQ2
 d/ A1 B8 Cw7 Bw6 DR3(17.1) DR52 DQ2



FAMILIA 4

a/A24 B35 Cw4 Bw6 DR1 DQ1
 b/ A2 B49 Cw7 Bw4 DR1 DQ1
 c/ A11 B35 Cw4 Bw6 DR1 DQ1
 d/ A2 B62 Cw3 Bw4 DR11 DR52 DQ3

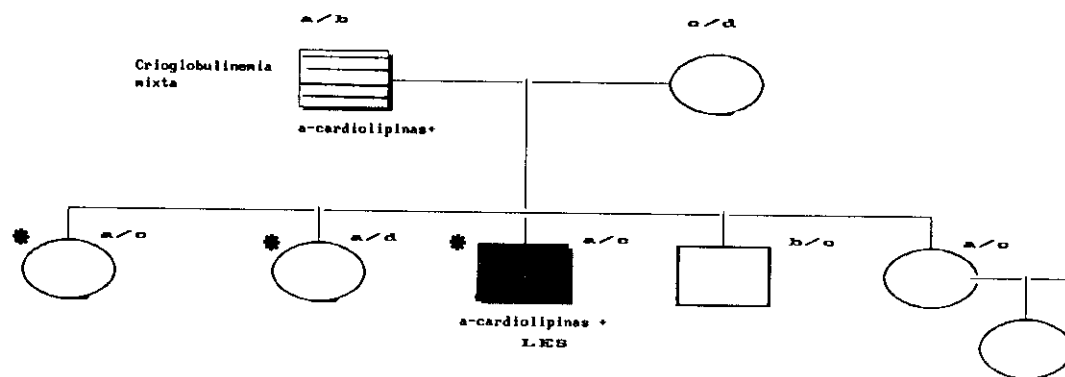


FIGURA 21. Arboles familiares, haplotipos HLA y principales características serológicas del grupo II de familias estudiadas. Familias con un caso de LES y otro/s casos de enfermedades autoinmunes. (*) ANA positivo

FAMILIA 5

a/ A1 B8 Cw7 Bw6 DR3(17.1) DR52 DQ2

b/ A2 B44 Cw4 Bw4 DR3(17.2) DR52 DQ2

c/ A1 B8 Cw7 Bw6 DR3(17.1) DR52 DQ2

d/ A2 B44 Cw5 DR4 DR53 DQ3

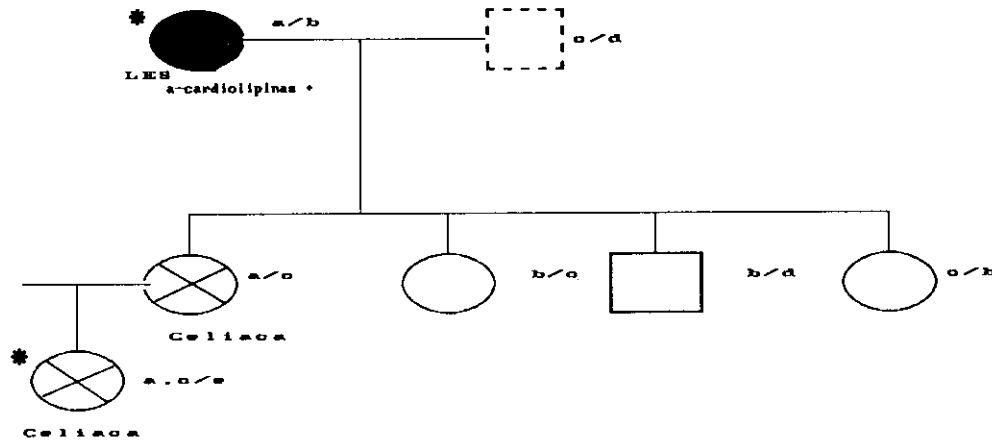


FIGURA 21 (Cont.). Arboles familiares, haplotipos HLA y principales características serológicas del grupo II de familias estudiadas. Familias con un caso de LES y otro/s casos de enfermedades autoinmunes. (*) ANA positivo

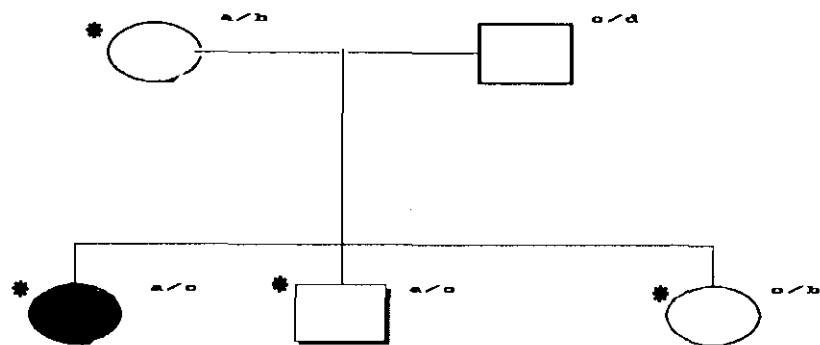
FAMILIA 6

a/ A23 B49 Cw5 Bw4 DR13(13a³) DR52 DQ1

b/ A11 B35 Cw4 Bw6 DR2(DR15) DQ1

c/ A30 B18 Cw5 Bw6 DR3(17.2) DQ2

d/ A33 B14 Cw5 BW6 DR3(17.2) DQ2



FAMILIA 7

a/ A28 B18 CwX Bw6 DR11 DR52 DQ3

b/ A2 B63 Cw7 Bw4 DR11 DR52 DQ3

c/ A28 B35 Cw4 Bw6 DR11 DR52 DQ3

d/ A23 B55 Cw3 Bw6 DR13 DR52 DQ1

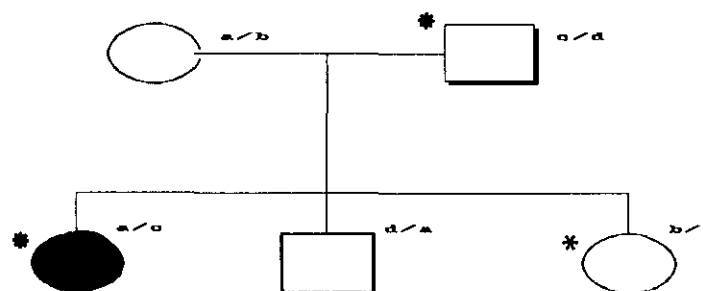
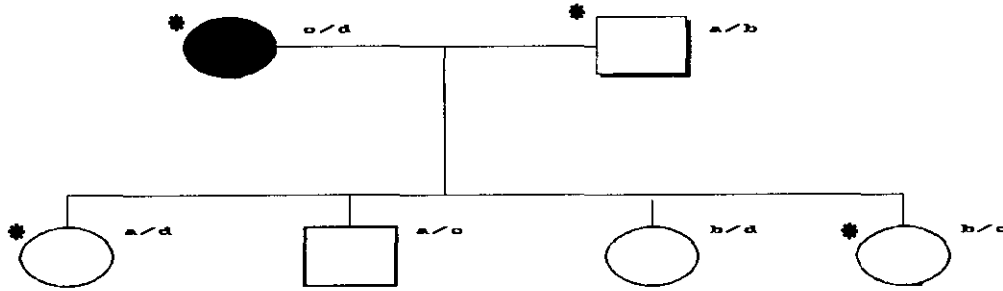


FIGURA 22 Arboles familiares, haplotipos HLA y características serológicas del grupo III de familias estudiadas. Familias SIMPLEX, con un solo caso de LES. (*) ANA positivo

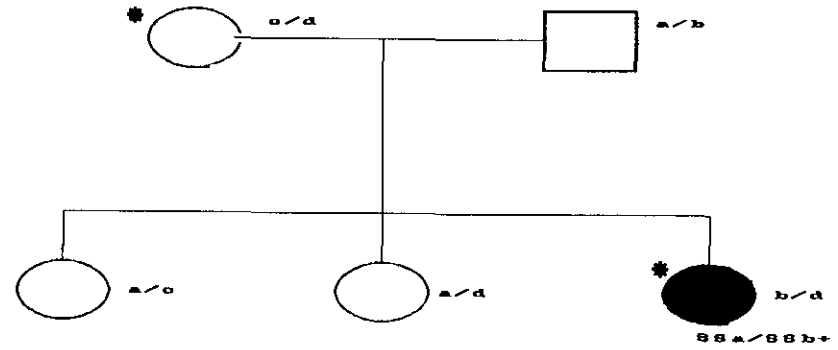
FAMILIA 8

- a/ A1 B7 Cwx Bw6 DR2(DR15) DQ1
- b/ A11 B27 Cw1 Bw4 DR1 DQ1
- c/ A26 B38 Cwx Bw4 DR4 DR53 DQ3
- d/ A24 B7 Cw7 Bw6 DR1 DQ1



FAMILIA 9

- a/ A1 B18 Cwx Bw6 DR11 DQ3 DR52 DQ3
- b/ A23 B8 Cw7 Bw6 DR13(13b) DQ1
- c/ A32 B61 Cwx DR13(13a^d) DR52 DQ1
- d/ A68 B50 Cw2 Bw4 DR3(17.2) DR52 DQ2



FAMILIA 10

- a/ A1 B8 Cw7 Bw6 DR3(17.1) DR52 DQ2
- b/ A1 B8 Cwx Bw6 DR3(17.1) DR52 DQ2
- c/ A11 B35 Cw4 Bw6 DR1 DQ1
- d/ A2 B39 Cw5 Bw6 DR1 DQ1

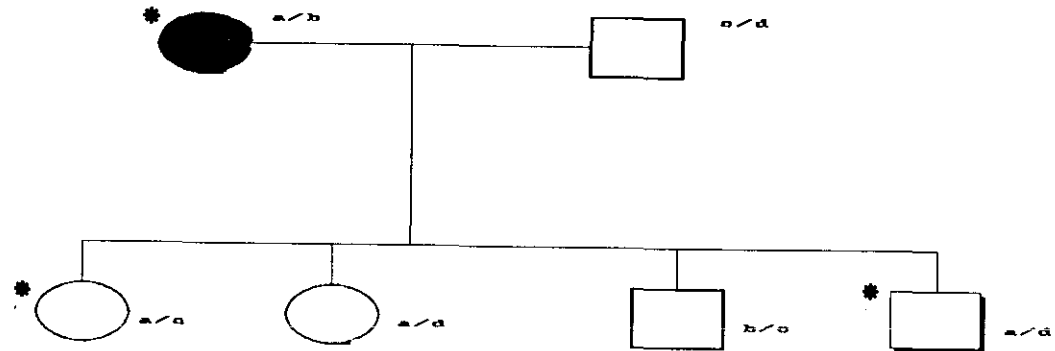


FIGURA 22. (Cont.). Arboles familiares, haplotipos HLA y características serológicas del grupo III de familias estudiadas. Familias SIMPLEX, con un solo caso de LES. (*) ANA positivo

caracterizado por sufrir una patología renal mediada por inmunocomplejos de carácter grave.

Con el objeto de realizar el análisis inmunogenético en grupos de carácter homogéneo dentro de la gran heterogeneidad de esta enfermedad, dividimos el grupo de enfermos en dos subgrupos clínicos: Enfermos con GNPD y sin GNPD. Los pacientes sin evidencia de daño renal no fueron biopsiados. De acuerdo con un estudio (preguntar cita a G.Reino) publicado previamente, de 20 enfermos biopsiados sin evidencia de daño renal, solamente uno fue diagnosticado de GNDP. Así, los pacientes de nuestro grupo, sin evidencia de daño renal, fueron incluidos en el grupo de GNPD negativa. Finalmente, los 58 enfermos de LES pueden subdividirse en:

22 LES con GNPD (GNPD +) y

36 LES sin GNPD (GNPD -)(No biopsiados y afectos de otras GN)

6. ANALISIS ESTADISTICO

Los fenotipos, los genotipos obtenidos del estudio de familias o por análisis de RFLP, así como las secuencias HLA asignadas, fueron analizadas en sanos y enfermos mediante técnicas estadísticas clásicas utilizando un ordenador personal Philips.

El grado de asociación de los marcadores estudiados(marcadores serológicos, RFLPs, secuencias) y el LES y/o sus manifestaciones como autoanticuerpos, se calculó por comparación de la frecuencia de dichos marcadores entre la población enferma y el grupo control sano. El nivel de significación de las asociaciones encontradas se calculó mediante la Chi cuadrado corregida por Yates.

	Enfermos	Normales
Marcador A	+ a	b
	- c	d

Total	N ₁	N ₂

Chi² Yates = $(ad-bd-0.5N)^2 \times N \times [(a+b) (c+d) \times N_1 \times N_2]$ donde a y b son las frecuencias absolutas del marcador A en enfermos y normales, respectivamente, N₁ y N₂ son los tamaños de las muestras de enfermos y normales. N= N₁+N₂; c= N₁-a; d= N₂-b. La significación estadística se estudió solo en las asociaciones con una probabilidad menor de 0.05 (p<0.05).

Los estimadores del grado de asociación utilizados son el riesgo relativo (R.R.) y la fracción etiológica (δ), con sus correspondientes niveles de significación.

6.1 Cálculo del riesgo relativo (R.R.) y la fracción etiológica (δ)

El riesgo relativo indica con qué mayor probabilidad se puede desarrollar una enfermedad en individuos portadores del antígeno, comparándolo con individuos sanos. Su cálculo se determina mediante la fórmula:

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

La fracción etiológica (δ) indica la influencia inmediata que un antígeno particular tiene en el desarrollo de la enfermedad. Su valor sólo puede utilizarse cuando el valor de RR es mayor de 1. Su cálculo se realiza utilizando la fórmula:

$$\delta = \frac{d-p}{1-p}$$

donde "d" es la frecuencia del antígeno (tanto por uno) entre los individuos con la enfermedad y "p" la frecuencia del antígeno en la población general.

La comparación de los valores de δ permite la medida de cuál de los diferentes marcadores HLA tiene la mayor fuerza de asociación con la enfermedad o sus manifestaciones. Esta medida tiene ventajas sobre el riesgo relativo cuando la asociación es

debida al desequilibrio de ligamiento entre el marcador genético y el auténtico marcador "enfermo", estrechamente ligado al anterior. Puesto que no conocemos cuál es el auténtico marcador de susceptibilidad, este tipo de análisis tiende a asignar los valores de δ más altos al marcador genético situado más cercano al auténtico locus de susceptibilidad (Bengtsson and Thomson, 1981; Thomson et. al. 1983).

6.2. Programas estadísticos

Para la obtención de los resultados se ha confeccionado el programa Prueba 1 en FORTRAN IV.

Características del programa "Prueba 1":

El programa calcula diversos parámetros, recibiendo como información: los fenotipos HLA -A, -B, -C Bw4, Bw6, DR, la presencia de los diferentes patrones de RFLP obtenidos, los parámetros clínicos evaluados y la presencia de autoanticuerpos. Con esta información el programa "Prueba 1" calcula:

- a) La frecuencia génica y fenotípica de cada alelo. Para ello cuenta el número de veces que aparece una variable en concreto en el volumen de datos, hallando la frecuencia de cada alelo (frecuencia fenotípica). La frecuencia génica es calculada por el programa mediante la aplicación de la fórmula:

$$p = 1-(1-f)$$

siendo p = frecuencia génica y f = frecuencia fenotípica.

- b) Realiza combinaciones entre los distintos grupos. Para ello cuenta el número de veces que una variable, va asociada a otra variable. El programa escribe tablas de contingencia de 2X2 (descritas anteriormente), realizando todas las combinaciones posibles entre los diferentes grupos.

- c) A partir de las frecuencias génicas, el programa calcula la frecuencia haplotípica esperada que se obtiene al multiplicar la frecuencia de cada uno por separado (p_1 = frecuencia del alelo 1, p_2 = frecuencia del alelo 2).

$$p = p_1 \times p_2$$

- d) Calcula el valor de desequilibrio de ligamiento utilizando la fórmula de Mattiuz. A partir de este valor de Δ el programa escribe la probabilidad corregida sumando al valor de la probabilidad haplotípica teórica.

$$H_{1,2} = + p_1 \times p_2$$

H = probabilidad haplotípica corregida

Δ = valor desequilibrio de ligamiento de Mattiuz

$p_1 \times p_2$ = probabilidad haplotípica teórica.

- e) A partir de las tablas 2X2 el programa calcula el valor de χ^2 y su correspondiente grado de significación de la asociación, aplicando la fórmula anteriormente descrita.

7. SOLUCIONES UTILIZADAS

Ampicilina : (20 mg/ml). Disolver 500 mg de ampicilina en 25 ml de etanol al 80 %. La dosis para cultivos líquidos (concentración final: 50 µg/ml) : 1,25 µl para 5 ml de LB; 1.5 ml para 600 ml de LB; 3.5 ml para 1,4 l de M9. Para cultivos en placa: 100 µl por placa.

Bromofenol Blue (BPB 5X): Tris, pH 7.6, 50 mM; EDTA 50mM; SDS 0.5%; BPB (azul de bromofenol) 0.1%; sacarosa 40 %.

ENA: Extracto de timo de conejo. Se pesan 8 gr de liofilizado de timo de conejo (Thymus Acetone powder, Pel freez. Biol. Rogers. Arkansas) y se disuelven en 50 ml de PBS durante 48 h en agitación y a 4°C. Después se centrifuga la solución, en frío, a 3000 rpm durante 20 mn. Recogemos el sobrenadante y ajustamos la cantidad de proteínas a aproximadamente 8mg/ml. Se alicuota y mantiene a -20°C hasta su utilización.

Formamida desionizada: El día de uso, pesar 5 g de resina AG 501-X8 (BioRad) por cada 100 ml de formamida. Agitar con imán durante 30 minutos. Eliminar la resina filtrando por papel de filtro.

Magic Denhart 50X: Para 200 ml :

1. Preparar 100 ml de BSA al 2% del siguiente modo: 2 g de BSA en 80 ml de agua bidestilada; ajustar el pH a 3.0 con HCl 2N; hervir durante 15 minutos; poner en hielo 10 minutos; ajustar sobre el hielo, el pH a 7.5 con NaOH 2N; enrasar con agua destilada hasta

100 ml.

2. Preparar 100 ml de PVP 40 al 2% Ficoll 400 al 2%. Autoclavar 30 mn a 100 °C.

3. Mezclar los 100 ml de cada una de las soluciones anteriores. Fraccionar y conservar a -20°C hasta su uso.

Medio de montaje: Disolver 2,5 gr de 1,4 Diazabicyclo octano (DABCO) en 30 ml de buffer glicina pH 8.6 (*). Ajustar a pH 8.6 utilizando ClH puro (1-2 ml). Enrasar hasta 100 ml con glicerol de buena pureza. Mantener a 4°C. (*) Buffer glicina pH 8.6: Pesar 14 gr de glicina, 1 gr de Azida sódica, 0,7 gr de Na OH y 17 gr de ClNa y disolver en 500 ml de Agua. Ajustar a pH=8.6 y enrasar a un litro con agua.

Medio rico LB: Pesar en un erlenmeyer: 6 g de bacto-triptona, 3 g de bacto yeast extract; 6 g de NaCl. Disolver en agua destilada y ajustar el pH a 7.5 con NaOH 2N. Ajustar el volumen final a 600 ml. Autoclavar.

Medio mínimo M9: Pesar en un erlenmeyer: 8.4 g de Na₂HPO₄; 4.2 g de KH₂PO₄; 0.7 g de NaCl; 1.4 g de NH₄Cl; 7.0 g de casaminoácidos. Disolver en agua bidestilada y ajustar el pH a 7.3 con NaOH 2N. Enrasar a 1.4 litros. Autoclavar. Añadir filtrando a través de un filtro Millex-0.22 µ, la siguiente mezcla: 2.8 ml de MgSO₄ 1M; 0.14 ml de CaCl 1M; 9.33 ml de glucosa al 30%.

OLB 5X: (Oligomer labelling buffer 5X): Solución 0: Tris pH 8.0, 1.25 M; MgCl₂ 0.125 M; conservar a 4°C. Solución A: 1 ml de solución 0; 5 µl

dATP; 5 μ l de dGTP; 5 μ l de dTTP; (cada nucleótido trifosfato previamente disuelto a 0.1M en Tris pH 7.0, 3mM/EDTA 0.2 mM). Conservar a -20 °C. Solución B: Hepes 2 mM llevado a pH 6.6 con NaOH 4N. Conservar a 4°C. Solución C: Hexadexinucleótidos (Pharmacia) resuspendidos en Tris, pH 7.0, 3mM/EDTA 0.2 mM a una concentración de 90 unidades ópticas (OD) por ml. Conservar a -20°C. Preparación de OLB 5X: Mezclar las soluciones A:B:C en las proporciones: 100:250:150.

PBS: (Phosphate Buffer Saline) 0.015 M, pH 7.2-7.4. Pesar 80 g de NaCl; 20.7 g de NaH₂PO₄; y añadir 94.6 ml de NaOH 1M . Disolver en agua destilada y enrasar a 10 litros.

PCI: (Phenol/Cloroformo/Isoamílico). Calentar fenol hasta su fusión completa en una estufa a 80°C durante toda la noche. Mezclar 3 volúmenes de fenol (750 ml) con un volumen (250 ml) de cloroformo isoamílico (24/1). Añadir 333 ml de Tris, pH 8.0 1M y mezclar vigorosamente. Centrifugar la mezcla durante 10 mn a 1500 rpm. Eliminar por aspiración la fase acuosa superior. Añadir a la fase orgánica (inferior) restante 333 ml de Tris pH 8.0, 0.1 M/Mercaptoetanol 0.2% y mezclar vigorosamente. Centrifugar la mezcla durante 10 minutos a 1500 rpm. Eliminar la fase acuosa superior. La fase orgánica inferior (que se denomina PCI) esta lista para su uso y debe conservarse a 4°C y en oscuridad.

Placas GD: Disolver 10 g de Bacto-triptona, 5g de bacto-Yeast extract y 5 g de NaCl en 1 l de

agua desionizada. Añadir 10 g de Bacto agar. Autoclavar. Dejar enfriar a 56°C y verter 25 ml por placa Petri.

Ro: Extracto de placenta humana. Se utiliza una placenta humana, recién alumbrada, a ser posible, de cesárea. Después de retirarle las tres capas con tijeras o bisturí, lavamos la placenta con PBS frío pH=7.2 con 0.2 M de Dithiothreitol (DTT) (mantiene los grupos -SH de las proteínas reducidos) 3 veces, 15 mn cada vez, en frío y agitación. Posteriormente, se retira el PBS y se homogeneiza con ayuda de POTTER o "minipimer". Filtramos el homogeneizado con una gasa doble y centrifugamos el líquido resultante a 10.000 g 1 hora a 4 °C. El sobrenadante resultante es medido con probeta y se añade la cantidad necesaria de sulfato amónico para saturar la solución al 30%. Después se repite la centrifugación 20mn a 10.000g a 4°C, El sobrenadante se satura seguidamente a un 60% con sulfato amónico y después se centrifuga de nuevo a las mismas condiciones anteriores. Finalmente , desechamos el sobrenadante y resuspendemos el precipitado en PBS. Esta solución se dializa frente a PBS 0.1M 24h y otras 24 h frente a PBS 0.01 M. Se alicuota y se almacena a -80°C hasta su uso.

RCLB: (Red Cell Lysis Buffer). Tris, pH 7.6, 0.001M; MgCl₂ 0.0005 M; NaCl 0.001 M.

Soluciones de prehibridación e hibridación:

Prehibridación: Formamida desionizada 50%; Magic Denhart 0.1%; SSPE 5X; SDS 1%; sulfato de dextrano 5%; ssDNA 200 ug/ml.

Hibridación: es exactamente igual a la solución anterior pero conteniendo la sonda previamente marcada.

ssDNA: 10mg/ml. Pesar 500 mg de DNA de esperma de salmón, añadir agua bidestilada hasta 40 ml; sonicar durante 30 ó 60 minutos; hervir durante 10 mn; poner en hielo durante 10 minutos; enrasar a 50 ml; fraccionar y conservar a -20°C.

SSPE 30X: NaCl 4.5 M, NaH₂PO₄ 0.3 M, EDTA 30 mM; Ajustar el pH a 7.7 con NaOH. Disolver toda la noche en agitación a temperatura ambiente.

Sulfato de Dextrano: al 50%. Pesar 250 g de sulfato de dextrano sobre una probeta de plástico de 500 ml. Añadir agua y agitar hasta que se disuelva la mayor parte del granulado. Dejar agitando toda la noche a 4°C. Fraccionar y conservar a -20°C hasta su uso.

Tampón Fosfato: (tampón de transferencia). NaH₂PO₄ 25 mM; Na₂HPO₄ 25 mM.

TE 1X: Tris 2M, EDTA 1 mM, pH 8.0.

TE 1:0.1: Tris 1 mM, EDTA 0.1 mM, pH 8.0.

TE 10:1: Tris 10mM, EDTA 1mM, pH 8.0.

TE 50X: Tris 50 mM, EDTA 1mM, pH 8.0.

TEA 50X: Tris 2M, Acido acético glacial 1M; EDTA 0.1 M. Ajustar el pH a 8.0 con ácido acético y filtrar por 0.22µ.

Tetraciclina: (2mg/ml). 1. Disolver 200 mg de tetraciclina en 100 ml de etanol al 80%. 2. La dosis para cultivos líquidos será (concentración final: 10µg/ml) 25 µl para 5 ml de LB; 3 ml para 600 ml de LB; 7 ml para 1.4 l de M9. 3. Para cultivos en placa: 200 µl por placa.

WCLB: (White Cell Lysis Buffer): Tris pH 7.6, 10 mM; EDTA, pH 8.0, 10 mM; NaCl 50 mM; SDS 0.2%; proteinasa K 200 µg/ml.

RESULTADOS

1. FENOTIPOS Y GENOTIPOS ESTUDIADOS

1.1 Fenotipos HLA-DR y DQ y aloenotopos estudiados en una muestra de individuos sanos no relacionados.

En la tabla 7 se muestran los fenotipos HLA-DR y DQ encontrados para los marcadores citados en una muestra de individuos españoles no relacionados, así como los patrones RFLP obtenidos utilizando diferentes sondas HLA.

1.2. Fenotipos HLA-DR y DQ y aloenotopos obtenidos en una muestra de individuos afectados de LES.

En la tabla 8 se muestran los fenotipos y aloenotopos HLA-DR y DQ obtenidos del análisis de los individuos afectados de LES.

1.3 Secuencias de DQA1 y DQB1.

Se han asignado las secuencias del exón 2 de las cadenas DQA1 y DQB1 en función de los aloenotopos encontrados, según lo detallado en el apartado 3 de pacientes y métodos y la tabla 6.

1.4 Correlación entre el tipaje HLA de clase II obtenido por serología y por RFLP.

Se ha descrito en varios trabajos, la inherente dificultad del tipaje de clase II por métodos serológicos en los enfermos de LES (Dunckley y col, 1986). Las razones que se postulan son, entre otras, el bajo número de linfocitos B, de poca viabilidad, la baja expresión de antígenos DR y DQ en la superficie, circunstancias ambas provocadas probablemente por el tratamiento administrado a estos enfermos y la presencia de anticuerpos antilinfocitarios que bloquean los antígenos HLA.

De los enfermos de LES fenotipados para clase II por serología

SEROLOGIA

RFLP

	HLA-A	-B	-Cw	Bw4/Bw6	-DR	HLA-DR	HLA-DQ	HLA-DRB1	HLA-DRB3/B4	HLA-DQA1	HLA-DQB1	HLA-DQA2
1	30,1	18,37	5,6	6,4	3,10	52,X	2,1	17.2,10	52b,-	2,1a	2a,10	UL
2	1,x	8,44	7,5	6,4	3,2	52,X	2,1	17.1,15	52a,-	2,1b	1a,1b	UU
3	1,2	8,44	7,X	6,4	3,Br	52,X	2,1	17.1,Br	52a,-	2,1a	2a,1a	UL
4	1,X	8,37	7,6	6,4	3,10	52,X	2,1	17.1,10	52a,-	2,1a	2a,1a	UL
5	2,24	7,w57	7,X	4,6	3,2	52,X	2,1	17.1,15	52a,-	2,1b	2a,1b	UL
6	2,3	18,7	5,7	6,6	3,4	52,53	2,3	17.2,4	52b,53	2,3	2a,3b	LL
7	1,29	8,44	7,X	6,4	3,7	52,53	2,2	17.1,7.1	52a,52b	2,3	2a,2b	UL
8	24,32	18,65	1,8	6,6	3,X	52,X	2,2	17.2,X	52b,X	2,2	2a,2a	LL
9	1,X	8,37	7,6	6,4	3,5	52,X	2,2	17.1,11	52a,52b	2,3b	2a,3b	UL
10	2,X	7,w53	4,X	4,6	3,6	52,X	2,1	17.2,13a ³	52b,52a	2,1b	2a,1a	LL
11	2,28	45,w62	1,6	6,6	4,7	53,X	3,2	4,7.1	53,X	3,3	3a,2b	LL
12	26,31	27,44	2,5	4,4	4,5	53,52	3,3	4,11	53,52b	3,3b	3b,3b	LL
13	2,29	49,44	7,X	4,4	7,4	53,X	2,3	7.1,4	53,X	3,3	2b,3a	LL
14	2,26	w57,w62	3,6	4,6	4,x	53,X	3,X	4,X	53,X	3,3	3a,3a	UU
15	11,29	49,44	7,X	4,4	4,7	53,X	3,2	4,7.1	53,X	3,3	3a,2b	UL
16	2,X	38,51	X,X	4,4	4,5	53,52	3,3	4,11	53,52b	3,3b	3a,3b	UU
17	2,11	27,w50	1,6	4,6	1,4	53,X	1,3	1,4	53,-	1a,3	1a,3a	UL
18	2,23	73,50	5,7	6,6	4,6	52,53	3,1	4,13b	53,52	3,3b	3b,3b	LL
19	1,26	44,w62	3,5	4,6	5,6	52,X	3,1	11,13a ¹	52b,52a	3b,1c	3b,1b	LL
20	2,31	13,14	5,6	4,6	1,10	X,X	1,1	1,10	-,-	1a,1a	1a,1a	UL
21	2,23	44,51	4,7	4,4	5,6	52,X	3,1	11,13a ⁴	52b,X	3b,1c	3b,1b	UL
22	32,29	39,44	X,X	6,4	1,7	53,X	1,2	1,7.1	53,-	1a,3	1a,2b	LL
23	2,w33	7,65	7,8	6,6	1,2	X,X	1,X	15,1	-,-	1b,1a	1b,1a	UL
24	29,w33	44,65	7,8	4,6	2,1	X,X	1,X	15,1	-,-	1b,1a	1b,1a	UL
25	2,X	18,w41	7,X	6,6	5,X	52,X	3,X	11,11	52b,X	3b,3b	3b,3b	UL
26	11,w33	7,w65	7,8	6,6	6,1	52,X	1,X	14a,1	52b,-	1a,1a	1a,1a	LL
27	25,24	18,w64	8,X	6,6	2,7	53,X	1,2	15,7.1	53,-	1b,3	1b,1b	LL
28	1,2	51,X	X,X	4,4	2,8	52,X	1,X	15,8	-,52b	1b,4	1b,3a	UL

TABLA 7. Fenotipos HLA-DR y DQ y alogeotopos obtenidos en una muestra de población sana.

SEROLOGIA

RFLP

	HLA-A	-B	-Cw	Bw4/Bw6	-DR	HLA-DR	HLA-DQ	HLA-DRB1	HLA DRB3/B4	HLA-DQA1	HLA-DQB1	HLA-DQA2
29	2,11	27,44	1,5	4,4	1,5	52,X	1,3					
30	11,24	7,35	4,7	6,6	1,2	X,X	1,1	1,11	52b,-	1a,3b	1a,3b	LL
31	2,32	w41,w65	7,8	6,6	1,X	X,X	1,X	1,15	-,	1a,1b	1a,1b	UU
32	2,X	7,44	5,7	4,6	2,6	52,X	1,1	1,1	-,	1a,1a	1a,1a	LL
33	2,3	13,w62	7,6	4,6	6,7	52,53	1,2	15,13a ¹	52a,-	1b,1c	1b,1b	UL
34	2,24	39,X	7,X	6,6	1,8	52,X	1,4	13a ⁴ ,7.2	52b,53	1c,3	1b,2b	UL
35	3,29	7,44	7,X	6,4	11,7	53,52	3,2	1,8	52b,-	1a,4	1a,4	LL
36	2,26	44,w52	5,X	4,4	1,15	X,X	1,1	11,7.1	52b,53	3b,3	3b,2b	LL
37	24,30	w50,w53	4,6	4,6	6,7	52,53	1,2	1,15	-,	1a,1c	1a,x	LL
38	2,11	51,35	4,X	4,6	5,6	52,X	3,1	13a ³ ,7.2	52a,53	1b,3	1a,2b	UL
39	30,3	18,51	5,1	6,4	3,6	52,X	2,1	11,13a1	52b,52a	3b,1c	3b,1b	LL
40	2,w33	14,51	X,X	4,6	3,9	52,53	2,3	17.2,13a ¹	52b,52a	2,1c	2a,1b	UL
41	30,w33	w22,14	X,X	6,6	6,7	52,53	3,2	17.2,9	53,52b	2,3	2a,3a	LL
42	11,26	18,14	6,X	4,6	2,X	X,X	1,X	13b,7.1	53,X	3b,3	3b,2b	LL
43	24,11	44,w62	3,X	4,6	7,9	53,X	2,3	15,X	-,	1b,1b	1b,1b	UU
44	2,X	49,w50	6,X	4,6	4,2	53,X	3,1	7.1,9	53,X	3,3	2b,3a	LL
45	2,23	39,45	6,X	6,6	4,5	53,52	3,3	4,15	53,-	3,1b	3a,1b	LL
46	11,30	35,w60	3,4	6,6	1,1	X,X	1,x	4,11	53,52b	3,3b	3a,3b	LL
47	25,1	18,14	5,X	6,6	2,7	53,X	1,2	1,X	-,	1a,1a	1a,1a	LL
48	29,31	35,64	4,8	6,6	1,6	52,X	1,X	15,7.2	53,-	1b,3	1b,2b	UL
49	26,32	14,18	X,X	6,6	6,7	52,53	1,2	1,13a ²	52a,-	1a,1c	1a,1b	UL
50	2,11	51,w55	3,X	4,6	5,7	52,53	3,2	14a,7.1	53,52b	1a,3	1a,2b	LL
51	2,X	18,w50	6,X	6,6	5,7	52,53	3,2	11,7.1	52b,53	3b,3	3b,2b	UL
52	1,11	w62,35	3,4	6,6	6,10	52,X	1,1	11,7.1	52b,53	3b,3	3b,2b	LL
53	11,29	14,17	X,X	4,6	2,7	53,X	1,3	13a ⁴ ,10	52b,-	1c,1a	1b,1a	UL
54	2,X	45,27	1,5	4,6	1,8	52,X	1,4	15,7.2	53,-	1b,3	1b,3a	UL
55	1,24	14,13	6,X	4,6	1,7	53,X	1,2	1,8	52b,-	1a,4	1a,3a	LL
56	1,11	44,35	4,X	4,6	2,6	52,X	1,X	1,7.2	53,-	1a,3	1a,2b	LL
57	1,2	w55,41	7,X	6,6	6,10	52,X	1,1	15,14a	52b,-	1b,1a	1b,1a	UU
58	2,29	44,X	5,X	4,6	9,10	53,X	3,1	13a ³ ,10	52c,-	1b,1a	1a,1a	UL
59	3,29	w17,w50	6,X	4,4	7,4	53,X	2,3	9,10	53,-	3,1a	3a,1a	LL
60	3,25	w62,35	3,4	6,6	3,5	52,X	3,2	7.2,4	53,X	3,3	2b,3b	UU
61	1,2	51,38	X,X	4,4	6,X	52,X	1,1	17.2,11	52b,X	2,3b	2a,3b	LL
62	30,2	18,14	5,X	6,6	3,X	52,X	2,X	13a ¹ ,X	52a,X	1c,1c	1b,1b	LL
63	30,2	18,51	5,X	6,4	3,5	52,X	2,3	17.2,X	52b,X	2,2	2a,2a	LL
64	1,32	8,35	7,4	6,6	3,3	52,X	2,X	17.2,11	52b,X	2,3b	3b,2a	UL
65	1,30	8,44	7,4	6,4	3,7	53,52	2,2	17.1,17.2	52a,52b	2,2	2a,2a	UL
66	2,29	w17,45	3,6	4,6	3,7	53,52	2,2	17.1,7.1	52a,53	2,3	2a,2b	UL
67	1,2	27,49	1,X	4,4	3,2	52,X	2,1	17.2,7.1	52b,53	2,3	2a,2b	LL
68	30,X	18,X	5,5	6,6	3,4	52,53	2,3	17.2,15	52b,-	2,1b	2a,1b	UL
69	2,X	44,X	4,5	4,4	5,7	52,53	3,2	17.2,4	52b,53	2,3	2a,3b	UL
								11,7.1	52b,53	3b,3	3b,2b	UL

TABLA 7. Fenotipos HLA-DR y DQ y aloenotopos obtenidos en una población sana (Cont.).

SEROLOGIA

RFLP

HLA-A	-B	-Cw	Bw4/Bw6	HLA-DR	HLA-DR	HLA-DQ	HLA-DRB1	HLA-DRB3/B4	HLA-DQA1	HLA-DQB1	HLA-DQA2	
1	29,x	7,14	X,X	6,6	2,3	52,X	1,2	15,17.2	-,52b	1b,2	1b,2a	UL
2	1,2	44,37	5,6	4,4	6,8	52,X	1,4	8,13a ¹	52b,52a	1c,4	1b,3a	UL
3	3,26	7,44	1,X	4,6	4,5	52,53	3,X	4,11	53,52b	3,3b	3b,3b	LL
4	2,29	7,35	4,X	6,6	2,8	52,X	1,X	8,15	52b,-	1b,4	1b,3a	LL
5	11,30	18,38	5,6	4,6	3,6	52,X	1,2	17.2,13a ³	53,52c	1c,2	2a,1b	LL
6	2,w33	14,18	5,X	6,6	3,X	52,52	2,X	17.2,X	52b,X	2,2	2a,2a	LL
7	2,30	38,45	X,X	4,6	1,5	52,X	1,3	1,11	52b,-	1a,3b	1a,3b	LL
8	3,24	7,51	1,7	4,6	2,X	X,X	1,X	15,X	-,	1b,1b	1b,1b	UU
9	24,30	18,51	5,X	4,6	3,4	52,53	2,3	17.2,4	52b,53	3,2	2a,3a	LL
10	32,29	17,49	X,X	4,4	7,8	52,53	2,3	7.2,4	52b,53	4,2	3a,2b	UL
11	2,X	44,38	X,X	4,4	2,3	52,X	1,2	15,17.1	52a,-	1b,2	2a,1a	UL
12	24,X	7,27	2,3	4,6	2,6	52,X	1,X	15,13a ⁴	52b,-	1c,1b	1b,1b	UU
13	3,24	35,X	4,X	6,6	2,5	52,X	1,3	15,11	-,52b	1b,3b	1b,3b	LL
14	2,23	51,w60	3,X	4,6	4,8	52,53	3,4	4,8	53,52b	4,3	3a,3a	UL
15	30,X	13,18	5,6	4,6	3,7	52,53	2,X	17.2,7.2	52b,53	3,2	2a,2b	LL
16	1,24	18,X	5,6	6,6	3,X	52,X	2,X	17.2,17.2	52b,X	2,2	2a,2a	LL
17	3,30	14,18	5,X	6,6	3,4	52,53	2,3	17.2,4	52b,53	3,2	2a,3a	UL
18	3,X	8,18	7,X	6,6	3,6	52,X	1,2	17.1,13a ⁴	52b,52a	1c,2	1b,2a	UU
19	2,3	7,45	6,7	6,6	2,5	52,X	1,3	15,11	52b,-	3b,1b	3b,1a	UL
20	1,2	8,44	4,7	4,6	3,X	52,X	2,X	17.1,17.2	52b,52a	2,X	2a,2a	LL
21	1,11	27,35	1,4	4,6	1,9	53,X	1,3	9,1	53,-	3,1a	1a,3a	LL
22	2,29	8,44	X,X	4,6	1,X	52,X	1,3	1,11	52b,-	1a,3b	1a,3b	LL
23	2,X	7,44	X,X	4,6	2,6	52,X	1,X	4,17.2	53,52b	3,2	3a,2a	UL
24	11,24	7,14	X,X	6,6	2,7	53,X	1,2	7.1,15	53,-	1b,3	2b,1b	UU
25	3,24	51,7	X,X	4,6	2,7	53,X	1,2	15,7.2	53,-	1b,3	1b,3a	LL
26	11,30	39,w63	X,X	4,6	2,5	52,X	1,3	15,11	52b,-	1b,3b	1b,3b	UL
27	26,11	35,51	4,X	4,6	7,6	52,53	1,2	7.1,14a	53,52b	1a,3	2b,1a	LL
28	1,2	49,w57	6,X	4,4	5,7	52,53	2,3	11,7.2	52b,53	3,3b	3b,3a	LL

TABLA 8. Fenotipos HLA-DR y DQ y aloenotipos en una población enferma de LES

SEROLOGIA

RFLP

HLA-A	-B	-Cw	Bw4/Bw6	HLA-DR	HLA-DR	HLA-DQ	HLA-DRB1	HLA-DRB3/B4	HLA-DQA1	HLA-DQB1	HLA-DQA2	
29	24,30	18,7	5,X	6,6	2,3	52,X	1,2	15,17.2	-,52b	2,1b	1b,2a	UL
30	3,30	7,35	4,X	6,6	2,6	52,X	1,X	15,13a ³	-,52c	1b,1b	1a,1b	UU
31	2,w33	7,14	X,X	6,6	5,6	52,X	1,3	17.2,17.2	X,52b	2,2	2a,2a	LL
32	23,26	35,18	4,X	6,6	2,10	X,X	1,X	7.1,11	53,52b	3,3b	3b,2b	LL
33	28,X	8,14	7,8	6,6	3,12	52,X	3,2	11,7.1	52b,53	3,3b	2b,3b	LL
34	26,30	18,w62	5,X	6,6	3,13	52,X	1,2	13a ³ ,17.2	52c,52b	1b,2	1a,2a	LL
35	25,30	18,w50	X,X	6,6	2,7	53,X	1,2	15,7.1	-,53	1b,3	1b,2b	UL
36	2,X	51,17	7,X	4,4	7,8	52,53	2,3	7.2,8	52b,53	4,3	3a,3b	LL
37	2,X	7,14	7,X	6,6	4,7	53,X	2,3	4,7.1	53,X	3,3	2b,3a	LL
38	3,28	18,35	4,5	6,6	2,3	52,x	1,2	15,17.2	-,52b	1c,2	2a,x	UL
39	23,32	17,14	6,x	4,6	3,7	52,53	2,x	17.1,7.2	52a,53	3,2	2a,3a	UU
40	2,X	44,17	5,X	4,4	3,7	52,53	2,X	17.2,7.1	53,52b	2,3	2a,2b	LL
41	24,30	18,X	5,X	6,6	3,X	52,X	2,X	17.2,X	52b,X	2,2	2a,2a	LL
42	1,X	8,X	X,X	6,6	3,X	52,52	2,X	17.1,X	52a,X	2,2	2a,2a	UL
43	2,30	35,15	3,4	6,6	5,6	52,X	1,3	8,13a ³	52c,52b	1b,3b	1a,3b	UL
44	1,11	8,35	4,X	6,6	3,5	52,X	2,3	11.1,17.1	52b,52a	2,3b	2a,3b	UL
45	24,30	35,X	4,X	6,6	5,6	52,X	1,3	11,13a ³	52c,52b	1b,3b	1a,3b	UL
46	1,2	44,w53	4,5	4,4	5,6	52,X	1,3	11,13a ⁴	52b,X	3b,1c	3b,1b	UL
47	30,1	13,18	6,X	4,6	5,7	52,53	2,3	11,7.2	53,52b	3,2	2b,3b	LL
48	28,X	18,35	4,X	6,6	5,X	52,X	3,X	11,X	52b,X	3b,3b	3b,3b	LL
49	25,28	w62,X	3,X	4,6	2,6	52,X	1,X	15,13a ⁴	-,52b	1b,1c	1b,1b	UL
50	2,28	7,w56	1,7	6,6	6,8	52,X	1,4	8,13a ³	52c,52b	4,1c	3a,1b	UL
51	1,X	35,w56	4,7	4,6	5,7	52,53	2,3	11,7.2	53,52b	1c,3	1b,2b	LL
52	1,32	8,51	X,X	4,6	3,4	52,53	2,3	17.1,4	52a,53	2,3	3a,2a	UU
53	30,23	18,49	5,X	4,6	3,6	52,X	1,2	17.2,13a ³	52b,52c	1b,2	1a,2a	LL
54	2,24	8,14	X,X	6,6	3,7	52,53	2,X	17.1,7.2	53,52a	3,2	2a,2b	UL
55	11,32	18,w50	5,6	6,6	3,7	52,53	2,X	17.2,7.1	52b,53	2,3	2a,2b	LL
56	1,2	8,27	2,X	4,6	1,3	52,X	1,2	1,17.1	-,52a	1a,2	2a,1a	UL
57	23,28	8,w50	6,7	6,6	3,X	52,X	2,X	17.2,13b	52b,-	2,3	2a,3a	LL
58	3,32	7,w60	,4X	6,6	1,3	52,X	1,2	17.1,1	-,52a	1a,2	2a,1a	UL

TABLA 8. Fenotipos HLA-DR y DQ y aloantígenos en una población enferma de LES (Cont.).

encontramos 11 individuos con un alelo "blanco" en HLA-DR (pacientes números: 6, 8, 16, 20, 22, 41, 42, 48, 57 y enfermos de LES en las familias n° 8 y 10). Nos propusimos estudiar el origen de estas asignaciones, determinando el genotipo HLA-DR, bien por estudio del tipaje de la familia, bien por tipaje HLA-DNA-RFLP.

Solamente fue posible el genotipaje familiar en 5 casos (pacientes :20 (fam 5); 48 (fam 7); 57 (fam 9) y familias 8 y 10). En los individuos de las 5 familias se determinó el nivel de expresión de HLA-DR en linfocitos y macrófagos mediante citometría de flujo, analizándose el resto de los casos mediante RFLPs.

Ocho de los 11 individuos estudiados (6, 8, 16, 20, 41, 42, 48 y LES familia 10) resultaron ser homocigotos para HLA-DR, hecho que fue confirmado en el estudio familiar o por tipaje RFLP. En los 3 individuos restantes (22, 57 y LES familia 8), se observó una falta de correlación entre los alelos HLA clase II asignados por serología y los asignados por RFLP. Sólo en uno de estos 3 individuos (LES familia 8) se observó una baja expresión de antígenos DR tanto en la superficie de linfocitos como en monocitos cuando se comparó con la observada en individuos sanos y en sus propios familiares de primer grado.

Por otra parte, cuando se comparó el tipaje HLA-DR determinado por DNA-RFLP con el anteriormente realizado por serología, en el grupo total de individuos afectados de LES, la correlación resultó ser muy buena, mayor de un 85%, por lo que se puede excluir la posibilidad de omisión de antígenos HLA DR por dificultades de tipaje (Tabla 9).

1.5 Descripción de nuevos HLA-DNA-RFLP.

El estudio del polimorfismo genético de los antígenos de clase II por la técnica de ADN-RFLP en el grupo de individuos con LES, puso de manifiesto la existencia de 2 nuevos RFLP, así como una asociación HLA-DR-DQ no descrita hasta ahora en la literatura. Se detallan a continuación y en la figura 20.

Tipaje DNA-RFLP	Nºde antígenos determinados	Concordancia con Fenotipo (%)
DR1	5	100
DR2	15	100
DR3	31	93
DR4	7	85
DR5	15	86
DR13	13	92
DR14	1	100
DR7	18	94
DR8	7	85
DR9	1	100
DR10	0	-
TOTAL	113	93
DQw1	36	97
DQw2	37	94
DQw3	26	84
TOTAL	99	92

TABLA 9. Correlación entre los resultados del tipaje serológico HLA de clase II con el realizado a nivel de DNA por RFLPs en el grupo de 58 afectados de LES.

* **RFLP Taq I/DRB pRTV, de 11.8 Kb.** Una banda de 11.8 Kb, no definida hasta ahora, se encontró asociada a un individuo de tipaje HLA-DR15,11. La banda de 13 Kb, perteneciente al alogenotopo del alelo DRw11 (Bidwell, Bignon, Strasbourg, 1990), y que correlaciona con la especificidad DRw52b, Dw25, está ausente en este caso y es sustituida por la nueva banda de 11.8 Kb (Figura 20). Ello sugiere la posibilidad de que esta banda defina una nueva especificidad de DRw52 (DRB3).

Se descartó la posibilidad de que fuera una banda parásita o una digestión incompleta o errónea al realizarse el estudio familiar en el que se pudo comprobar que la banda segregaba en la familia del individuo (Figura 20). Estaba presente en dos individuos de la familia (una hermana y un hijo del individuo afecto de LES, estudiado en primer lugar), ambos con tipaje HLA-DR11.

No parece que esta banda pueda asociarse a LES, ya que solo se ha determinado en este individuo aislado y su presencia en la familia no se relaciona con la aparición de LES u otras manifestaciones autoinmunes.

El siguiente paso consistió en la secuenciación del exon 2 del dominio β 1 de la cadena β del gen DRB3. Ello se llevó a cabo mediante los siguientes pasos:

- Reacción de PCR (polymerase chain reaction) específica del exon 2 del gen DRB con los oligonucleótidos para la amplificación genérica de genes DRB: DRBAmp-A: 5'-CCCCACAGCAGGTTTCTTG-3' y DRBAmp-B: 5'-CCGCTGCACTGTGAAGCTCT-3' de la cual obtenemos un producto de 262 bp (Kimura y col, 1992).
- Clonaje en fago M13 del producto de PCR (según protocolo descrito en Corell y col, 1992).
- Secuenciación automática de los clones M13 con el inserto del exon 2 de DRB. (Corell y col., 1992)

Se lograron 4 clones con el inserto del exon 2 del gen DRB3 que presentaban idéntica secuencia a la de la especificidad DRw52 b (DRB3*0201), publicada en la literatura (Marsh y col., 1992). De este hecho se deduce que las diferencias de la restricción encontradas para este alelo no se sitúan en el exón 2 y podrían situarse en otros exones o regiones no codificantes del gen DRB3 (Segurado y col, 1991).

* **RFLP TaqI/pRTV de 2,65 Kb.** Esta banda aparece en el tipaje DRB de un individuo sano, hermano de un enfermo de LES. Es una banda añadida a las que constituyen los patrones característicos de los alelos HLA-DR15 y 17.2. La banda segrega en la familia (de madre a hijo) asociada a al alelo HLA-DR15 (Figura 20). Se determinó que el exón 2 del gen DRB1 de estos individuos DR15 positivos era el correspondiente al alelo DRB1*1501, mediante la técnica de PCR, este caso, una amplificación específica del exon 2 del gen DRB del alelo DRB1-DR2 (oligonucleótidos:DRB Amp-2: 5'TTCCTGTGGCAGCCTAAGAGG-3' y DRBAmp-B: 5'-CCGCTGCACTGTGAAGCTCT-3'), e hibridación con oligosondas específicas de DRB*1501 mediante la técnica de PCR-SSO (Polimerase Chain Reaction- sequence specific oligonucleótidos) que consiste básicamente en una reacción de PCR, transferencia a filtros de nylon del producto amplificado e hibridación con oligosondas específicas de los diferentes alelos de DRB1-DR2 (Kimura y col, 1992). La presencia de esta nueva banda podría deberse a un nuevo sitio de restricción para Taq I en otros exones o zonas no codificantes de los genes DRB en el haplotipo HLA-DR15, segregado en estos individuos.

** **Asociación HLA-DR13b-DQ9.** Al determinar el genotipo HLA (DNA-RFLP) de un paciente afecto de LES se encontró una asociación del alelo HLA DR13b y los alelos DQA 3,DQB 3a (DQ9) en vez de su asociación clásica a DQ7. Esta nueva asociación DR13b-DQ9 es segregada en la familia del padre al hijo (Figura 20) y no ha sido previamente descrita en sanos, ni tampoco parece tener relación con la enfermedad LES ya que sólo ha podido determinarse en un caso aislado en el grupo de LES estudiado.

1.6 Alotipos de los factores Bf y C4 del complemento.

Se muestran los alotipos de los factores Bf y C4 del complemento

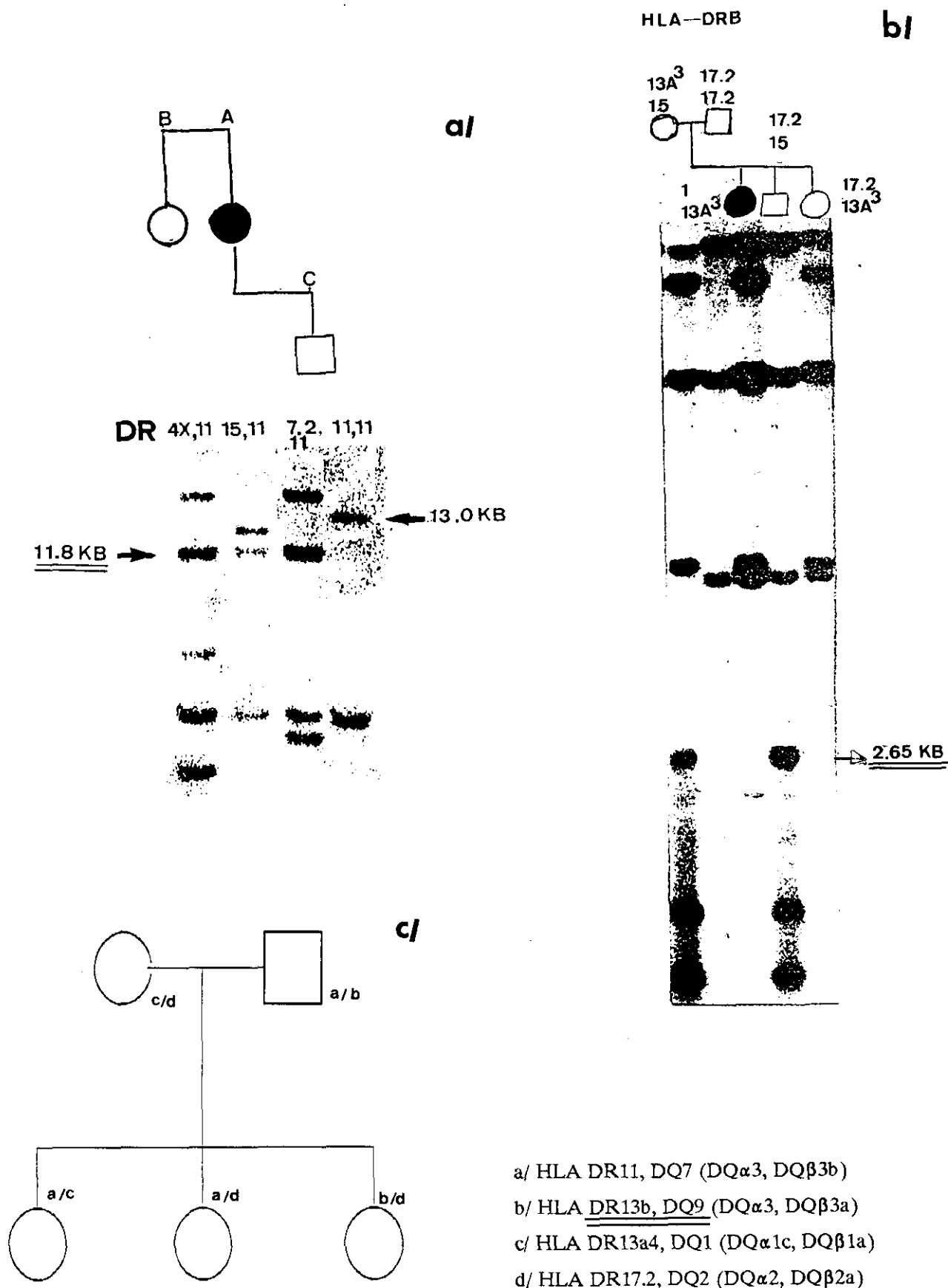


FIGURA 23. Esquema de los nuevos RFLPs y la nueva asociación HLA-DR-DQ encontrados en el análisis de inmunogenética HLA en el grupo de LES estudiado. a) 11,8 Kb RFLP DR Taq I/pRTV1. Ligado al alelo HLA-DR11 presente en la enferma (A) y que segrega en una hermana de la misma (B) y un hijo (B). b) 2,65 Kb RFLP DR Taq I/pRTV1. Se muestra la segregación de este RFLP ligado al alelo HLA-DR15 en la familia. c) Nueva asociación HLA DR-DQ: DR13b-DQ9. Se muestra la segregación de este haplotipo en la familia.

determinados en el grupo de 52 individuos sanos (tabla 10) y en el grupo de 53 enfermos de LES (tabla 11).

1.7 Genes de los factores C4 y 21-OH.

En las tablas 9 y 10 se muestra también el análisis de los genes del factor C4 del complemento y del factor 21-hidroxilasa en individuos sanos y enfermos respectivamente. El polimorfismo Taq I/p-ATA , tal como se detalla en el apartado 2.3.4 de Pacientes y Métodos, nos da información sobre las deleciones y posibles duplicaciones de estos genes, así como del tamaño del gen C4B (leyenda tablas 10 y 11).

2. PRINCIPALES MANIFESTACIONES CLINICAS Y SEROLOGICAS (AUTOANTICUERPOS) EN LOS ENFERMOS DE LES

En la tabla 12 se muestran las principales características clínicas del LES de los 58 enfermos estudiados así como la presencia o ausencia en el suero de estos pacientes de anticuerpos ANA, anti-DNA, ENA y anti-Ro, específicos de LES.

3. ASOCIACIONES MAS RELEVANTES DEL SISTEMA HLA Y LES EN UN GRUPO DE LA POBLACION ESPAÑOLA.

3.1 Antígenos de clase I,II en LES (GNPD+,GNPD-).

3.1.1. Asociaciones serológicas significativas.

En la tabla 13 se muestran las frecuencias de los antígenos HLA clase I y II determinados por técnicas serológicas observadas en los pacientes de LES y los subgrupos GNPD+ y GNPD- y las encontradas en el grupo control sano. La tabla 14 resume las asociaciones serológicas significativas cuando se comparan los grupos de LES y el grupo control. La determinación del fenotipo HLA muestra un aumento de la frecuencia del alelo DR3 en el grupo de enfermos de LES que es estadísticamente significativo ($p=0.002$) en el grupo de LES con GNPD cuando se compara con el de controles sanos.

ALOTIPOS		GENES						ALOTIPOS		GENES					
Bf	C4A	C4B	C4A	C4B	21-OHA	21-OHB	Bf	C4A	C4B	C4A	C4B	21-OHA	21-OHB		
SS	3,Q0	1,2	A,Ad	L,(d)	A,D	B,B	34.	SS	3,4	1,2	A,A	S,S	A,A	B,B	
SS	4,Q0	1,5	A,Ad	S,(d)	A,D	B,B	35.	FF	3,3	1,Q0	A,A	L,S	A,A	B,B	
SF	3,Q0	1,1	A,Ad	S,(d)	A,D	B,B	36.	SS	3,2	1,2	A,A	L,S	A,A	B,B	
SS	3,Q0	1,1	A,Ad	L,(d)	A,D	B,B	38.	FS1	3,Q0	1,1	A,A	L,L	A,A	B,B	
SF1	3,3	Q0,Q0	A,A	L,Bd	A,D	B,B	39.	FF1	3,3	Q0,Q0	A,A	L,Bd	A,D	B,B	
SF	3,Q0	1,1	A,Ad	S,(d)	A,D	B,B	40.	SS	3,2	1,2	A,A	L,S	A,A	B,B	
1. SF	3,3	1,2	A,A	S,S	A,A	B,B	41.	FF1	3,2	1,1	A,A	S,S	A,A	B,B	
2. FS	3,3	1,Q0	A,A	L,L	A,A	B,B	42.	SS	3,Q0	1,1	A,A	L,L	A,A	B,B	
3. FS	3,Q0	1,1	A,Ad	S,(d)	A,D	B,B	43.	SS	4,4	2,2	A,A	S,S	A,A	B,B	
4. FF	3,3	1,3	A,A	L,S	A,D	B,B	44.	SS	3,2	1,1	A,A	L,S	A,A	B,B	
5. SS	3,6	1,2,9	A,A	S,S	A,A	B,B	45.	SF	3,3	1,2	A,A	L,S,S	A,A	B,B	
6. SS	3,3	1,1	A,A	L,L	A,A	B,B	46.	SS	3,Q0	1,2	A,A	L,S	A,A	B,B	
8. FS	3,Q0	1,1	A,Ad	S,(d)	A,D	B,B	48.	FS	3,2	1,Q0	A,A	L,S	A,A	B,B	
9. SS	3,3	1,2	A,A	S,S	A,A	B,B	49.	SS	3,Q0	1,2	A,A	S,S	A,A	B,B	
0. SS	4,Q0	1,5	A,A	S,S	A,A	B,B	50.	SS	3,Q0	1,1	A,A	L,S	A,A	B,B	
1. FS	3,3	1,Q0	A,A	L,Bd	A,D	B,B	51.	FS	2,Q0	1,1	A,A	L,S,S	A,A	B,B	
2. FS	3,Q0	1,3	A,A	L,S	A,A	B,B	53.	SS	3,6	1,Q0	A,A	L,S	A,A	B,B	
3. SS	3,2	1,2	A,A	L,S,S	A,A	B,B	55.	SS	2,Q0	1,2	A,A	S,S	A,A	B,B	
4. SS	3,2	1,2	A,A	S,S	A,A	B,B	56.	SS	3,3	1,Q0	A,A	L,Bd	A,D	B,B	
6. SS	4,2	1,2	A,A	S,S	A,A	B,B	57.	SF	3,3	1,3	A,A	S,S	A,A	B,B	
7. SS	3,4	2,2	A,A	S,S	A,A	B,B	58.	FF	3,3	1,Q0	A,A	L,S	A,A	B,B	
8. SS	3,3	1,1	A,A	L,L	A,A	B,B	62.	SF1	3,2	1,2	A,A	S,S	A,A	B,B	
9. SS	3,3	1,2	A,A	L,L	A,A	B,B	63.	SF1	3,3	1,Q0	A,A	S,S	A,A	B,B	
0. SS	3,3	1,Q0	A,A	L,Bd	A,D	B,B	65.	FS	3,Q0	1,1	A,Ad	S,(d)	A,D	B,B	
2. FS	3,3	1,Q0	A,A	L,L	A,A	B,B	66.	FF	3,3	1,1	A,A	S,S	A,A	B,B	
3. FS	3,3	1,Q0	A,A	L,S	A,A	B,B	67.	SF1	3,3	1,Q0	A,A	Bd,Bd	D,D	B,B	

d = Delección en C4A,21-OHA y parte de C4B representada por una banda de 6.4 Kb.

1) = Delección parcial de C4B debida a la delección de C4A (6.4Kb)

d = Delección en C4B independiente de C4A.

o = Delección en 21-OHA

Tabla 10. Alotipos de los factores Bf y C4 y polimorfismo génico (RFLP Taq I /p-AT-A,pC21a) de C4 21-OH en un grupo de 52 individuos sanos.

ALOTIPOS				GENES				ALOTIPOS				GENES			
Bf	C4A	C4B	C4A	C4B	21-OHA	21-OHB	Bf	C4A	C4B	C4A	C4B	21-OHA	21-OHB		
SS	2,Q0	1,2	A,A	L,S	A,A	B,B	27.	FS	3,3	1,Q0	A,A	S,Bd	A,D	B,B	
FS	3,3	2,Q0	A,A	L,S	A,A	B,B	28.	SS	3,6	1,1	A,A	L,S	A,A	B,B	
FS	3,3	Q0,Q0	A,A	L,Bd	A,D	B,B	29.	SF1	3,3	1,Q0	A,A	L,Bd	A,D	B,B	
SS	3,3	1,Q0	A,A	S,Bd	A,D	B,B	30.	FS	3,Q0	1,1	A,A	L,S,S	A,A	B,B	
SF	3,2	1,Q0	A,A	L,Bd	A,D	B,B	31.	SF	3,3	1,1	A,A	L,S	A,A	B,B	
SF1	3,3	1,2	A,A	S,S	A,A	B,B	32.	SS	3,Q0	1,1	A,A	L,S	A,A	B,B	
FS	3,3	1,Q0	A,A	L,S	A,A	B,B	33.	SS	3,Q0	1,1	A,A	S,S	A,A	B,B	
SS	3,1,2	1,Q0	A,A	S,L	A,A	B,B	34.	FF	3,3	1,Q0	A,A	S,Bd	A,D	B,B	
SF1	3,3	1,Q0	A,A	L,Bd	A,D	B,B	35.	SF	3,3	1,2	A,A	S,S	A,A	B,B	
FS	3,Q0	1,Q0	A,Ad	S,(d)	A,D	B,B	36.	SF	3,6	1,1	A,A	L,S,S	A,A	B,B	
FS	3,Q0	1,1	A,A	S,S,L	A,A	B,B	37.	SS	3,3	1,1	A,A	L,S	A,A	B,B	
FS	3,3	1,Q0	A,A	L,L	A,A	B,B	38.	SF1	3,3	1,Q0	A,A	L,Bd	A,D	B,B	
SS	3,3	1,1	A,A	L,L	A,A	B,B	39.	SS	6,2	1,2	A,A	S,S,S	A,A	B,B	
SS	3,Q0	1,2	A,Ad	L,(d)	A,D	B,B	40.	FS1	3,2	1,1	A,A	S,S,S	A,A	B,B	
SF1	3,3	1,Q0	A,A	S,Bd	A,D	B,B	41.	F1F1	3,3	Q0,Q0	A,A	Bd,Bd	D,D	B,B	
F1F1	3,3	Q0,Q0	A,A	Bd,Bd	D,D	B,B	42.	SF1	Q0,Q0	1,Q0	Ad,Ad	(d),(d)	D,D	B,B	
SF1	3,3	1,Q0	A,A	S,Bd	A,D	B,B	43.	FS	3,Q0	1,1	A,Ad	S,(d)	A,D	B,B	
SS	3,Q0	1,2	A,Ad	S,(d)	A,D	B,B	44.	SS	3,Q0	1,Q0	A,Ad	(d),d	D,D	B,B	
SS	3,3	1,Q0	A,A	S,S	A,A	B,B	45.	FS	3,Q0	1,1	A,A	S,S,S	A,A	B,B	
SF1	3,Q0	1,Q0	A,Ad	Bd,(d)	D,D	B,B	46.	SS	3,3	1,1	A,A	L,L,S	A,A	B,B	
FF	3,3	Q0,Q0	A,A	L,L	A,A	B,B	47.	SS	3,Q0	1,1	A,A	L,S	A,A	B,B	
SS	3,Q0	1,1	A,Ad	L,(d)	A,D	B,B	50.	FF	3,3	1,Q0	A,A	Bd,L	A,D	B,B	
SS	3,1	2,2	S,S	A,A	S,S,S	A,D	51.	FS	3,3	1,1	A,A	S,L	A,A	B,B	
SS	3,3	1,Q0	A,A	S,L	A,A	B,B	53.	SF1	3,3	2,2	A,A	S,S	A,A	B,B	
SS	3,3	1,1	A,A	L,L	A,A	B,B	56.	SS	3,3	1,2	A,Ad	L,(d)	A,D	B,B	
SS	3,3	1,2	A,A	L,S	A,A	B,B	57.	SS	2,3	1,1	A,A	S,S	A,A	B,B	
							58.	SS	3,Q0	1,1	A,Ad	L,(d)	A,D	B,B	

d = Delección en C4A,21-OHA y parte de C4B representada por una banda de 6.4 Kb.

(d) = Delección parcial de C4B debida a la delección de C4A (6.4Kb)

d = Delección en C4B independiente de C4A.

= Delección en 21-OHA

ABLA 11. Alotipos de los factores Bf y C4 y polimorfismo génico (RFLP Taq I/pAT-A,pC21a) de C4 y 21-OH en un grupo de 53 afectados de LES no relacionados.

A F E C T A C I O N

A U T O A N T I C U E R P O S

Ro

	PULMONAR	CARDIACA	NEUROLOG	A.HEMO*	RENAL* GN	ANA	a-DNA	ENA	CIE*	IB*
1.	NO	NO	NO	NO	MES	+	-	-	+	-
2.	NO	NO	NO	NO	NB	+	-	-	-	-
3.	SI	NO	NO	NO	MES	+	-	-	-	-
4.	NO	NO	NO	NO	GNPD	+	+	-	-	-
5.	SI	NO	NO	NO	NB	+	-	+NI	-	-
6.	SI	SI	SI	NO	GNPD	+	-	-	-	-
7.	SI	NO	NO	NO	MEM	+	-	-	+	-
8.	SI	NO	NO	NO	NB	+	-	-	-	-
9.	SI	NO	NO	NO	NB	+	-	+SSb	+	-
10.	SI	SI	NO	NO	NB	+	-	-	+	+60Kd
11.	NO	NO	NO	NO	MES	+	-	-	+	-
12.	NO	NO	NO	NO	MES	+	-	-	-	-
13.	SI	NO	NO	NO	NB	-	-	-	-	-
14.	NO	NO	NO	SI	NB	+	+	-	-	-
15.	NO	NO	NO	NO	GNPD	+	-	-	+	+60Kd
16.	NO	NO	NO	NO	GNPD	+	-	+Sm	-	-
17.	NO	NO	SI	NO	GNPD	-	-	-	-	-
18.	NO	NO	NO	NO	GNPD	-	-	-	-	-
19.	NO	NO	NO	NO	MES	+	+	-	+	-
20.	NO	NO	NO	SI	NB	+	-	-	-	-
21.	NO	NO	NO	SI	GNPD	+	-	-	-	-
22.	NO	NO	NO	NO	PF	+	-	-	-	-
23.	NO	SI	NO	SI	GNPD	+	-	-	-	-
24.	NO	NO	NO	NO	NB	+	-	-	+	+60Kd
25.	NO	NO	SI	NO	MEM	+	-	-	-	-
26.	SI	NO	NO	NO	PF	+	-	-	-	-
27.	NO	NO	NO	NO	NB	+	-	-	-	-
28.	NO	NO	NO	NO	PF	+	-	-	-	-
29.	NO	SI	NO	NO	NB	+	+	+RNP	-	-

(*) A.HEMOL = Anemia hemolítica. GN= Glomerulonefritis; MES= Mesangial; MEM= Membranosa; PF= Proliferativa; GNPD= Glomerulonefritis proliferativa difusa; NB= No biopsiado.

(&) CIE: Contrainmunoelctroforesis; IB: Inmunoblotting.

TABLA 12. Características clínicas y serológicas de 58 enfermos de LES

A FECTACION

AUTOANTICUERPOS

Ro

	PULMONAR	CARDIACA	NEUROLOG	A.HEMO*	RENAL* GN	ANA	a-DNA	ENA	CIE*	IB*
30.	NO	NO	NO	SI	PF	+	+	-	+	+60Kd
31.	SI	NO	NO	SI	GNPD	+	+	-	-	-
32.	NO	NO	NO	NO	NB	+	+	-	+	-
33.	NO	NO	NO	SI	NB	+	-	+SSb	+	+60Kd
34.	NO	NO	NO	SI	GNPD	+	+	-	-	-
35.	NO	NO	NO	NO	GNPD	+	-	-	-	-
36.	NO	NO	NO	SI	NB	+	-	+Sm	+	+60,52Kd
37.	NO	NO	NO	NO	NB	+	-	-	-	-
38.	SI	NO	NO	NO	GNPD	+	-	-	-	-
39.	SI	NO	NO	NO	GNPD	+	+	+RNP	-	-
40.	NO	SI	NO	NO	GNPD	+	-	-	-	-
41.	NO	NO	NO	SI	GNPD	+	+	-	-	-
42.	SI	SI	NO	NO	NB	+	+	-	-	-
43.	NO	NO	SI	NO	GNPD	+	-	-	-	-
44.	NO	NO	NO	NO	GNPD	+	-	-	-	-
45.	NO	NO	NO	SI	NB	+	-	-	-	-
46.	NO	NO	SI	NO	NB	+	+	-	-	-
47.	NO	NO	NO	NO	PF	+	-	-	-	-
48.	NO	NO	NO	NO	MES	+	+	-	-	-
49.	NO	NO	SI	NO	NB	+	-	-	-	-
50.	SI	NO	NO	NO	PF	+	-	-	-	-
51.	SI	NO	NO	NO	GNPD	+	-	-	+	+60Kd
52.	NO	NO	NO	NO	NB	+	-	-	-	-
53.	NO	NO	NO	NO	GNPD	+	-	-	-	-
54.	NO	NO	NO	NO	NB	+	-	+SSb	+	+60Kd
55.	SI	NO	NO	NO	GNPD	+	-	-	+	-
56.	NO	SI	NO	NO	GNPD	+	-	-	+	-
57.	NO	NO	NO	NO	NB	+	-	+SSb	+	-
58.	NO	NO	NO	NO	GNPD	+	-	+RNP	+	-

(*) A.HEMOL = Anemia hemolítica. GN= Glomerulonefritis; MES= Mesangial; MEM= Membranosa; PF= Proliferativa; GNPD= Glomerulonefritis proliferativa difusa; NB= No biopsiado.

(&) CIE: Contrainmunolectroforesis; IB: Inmunoblotting.

TABLA 12. Características clínicas y serológicas de 58 enfermos de LES (Cont.).

Hay un aumento significativo del haplotipo (A30) Cw5 B18 BFF1 C4A3 C4BQ0 DR3 DQ2 en el grupo de GNPD ($p=0.001$) mientras que el haplotipo (A1) Cw7 B8 BFS C4AQ0 C4B1 DR3 DQ2, típicamente asociado a LES en otras poblaciones, no está incrementado ni en el grupo total de enfermos ni en ninguno de los subgrupos clínicos.

El antígeno DR2 no está incrementado en ninguno de los grupos estudiados cuando se compara su frecuencia con la hallada en los controles sanos, a diferencia de lo que ocurre en otras poblaciones (Schur y col., 1982). El resto de los antígenos HLA de clase I y II, determinados por serología, no tiene asociación relevante con la enfermedad en el grupo estudiado.

3.1.2. Frecuencia de los aloenotopos de DRB, DQA y DQB.

La tabla 15 muestra las frecuencias de los aloenotopos HLA de clase II en el grupo de LES estudiados y en el grupo control (la nomenclatura utilizada está tomada de Bidwell, 1988 y Segurado y col., 1990). Las asociaciones significativas encontradas después de realizarse las comparaciones entre los grupos se resumen en la tabla 16.

a) Asociaciones positivas:

DR3. Se encontraron dos patrones de RFLP-Taq I asociados con la especificidad serológica DR3: DR17.1 y DR17.2. Sólo el alelo DR17.2 (ligado a HLA-B18) está asociado significativamente al grupo de LES con GNPD cuando es comparado con el grupo GNPD- y los controles sanos ($p=0.003$ y $p=0.0008$ respectivamente). Este alelo también está incrementado en el grupo total de LES aunque no significativamente frente a controles. El alelo DR17.1, asociado a HLA-B8, no está incrementado en el grupo de enfermos de LES estudiados. Las dos especificidades DR17.1 y 17.2 presentan diferentes patrones de Taq I-RFLP que marcan diferencias en sus alelos DRB3 asociados (52a y 52b respectivamente) y en zonas no codificantes en DRB1 (Segurado y col, 1991).

DQ α 2 y DQB2. También se encuentra incrementada la frecuencia de estos dos alelos en el grupo GNPD+ ($p=0.0004$ frente a GNPD- y $p=0.0004$ frente a controles). Esto es debido

probablemente al fuerte desequilibrio de ligamiento con el antígeno DR17.2.

b) Asociaciones negativas:

DQ α 1a. Este alelo aparece significativamente disminuido en el grupo de LES con GNPD y en el grupo total de enfermos cuando se comparan con individuos control ($p=0.02$).

DR1. El alelo DR1, en desequilibrio de ligamiento con DQ α 1a esta disminuido ($p=0.04$) en el grupo total de LES.

El resto de los aloenotopos DRB, DQA y DQB no muestran desviaciones relevantes en sus frecuencias en el grupo de LES sus dos subgrupos clínicos frente a controles sanos.

3.1.3. Secuencias de DQA1 y DQB1.

Hemos asignado las secuencias del exon 2 de DQA1 y DQB1, según se describió en el apartado 3 de Pacientes y Métodos., y tabla 6 en los pacientes de LES y controles. En la tabla 17 se muestran las frecuencias de las secuencias HLADQ en el grupo de LES comparadas con el grupo de sanos. Se ha encontrado un incremento de la secuencias DQA*0501 y DQB*0201, ambas asociadas a DR17, en el grupo de LES con GNPD. Ello se explica fácilmente por el fuerte incremento de la frecuencia del haplotipo HLA-DR17.2/DQ α 2/DQ β 2a en este grupo.

También y como podía esperarse, la secuencia DQA1*0101 (secuencia asociada a el alelo DQ α 1a) presenta una frecuencia significativamente disminuida en el grupo de GNPD- y LES total cuando se compara con controles sanos.

3.2 Antígenos de clase III y LES

3.2.1. Frecuencias de alotipos de los factores Bf y C4.

Se encuentra incrementado con una frecuencia muy elevada ($p=0.006$) el alelo **BfF1** en el grupo de LES GNPd+ cuando se compara con el grupo de GNPd- o el grupo control (Tabla 18). Este hecho confirma estudios previos del factor B del complemento realizados en otro grupo de LES en la población española (Martin Villa y col, 1986). Ello confirma el posible papel determinante del haplotipo A30 B18 Cw5 BfF1 C4A3 C4BQ0 DR3 DQw2 en la susceptibilidad al daño renal por inmunocomplejos en los pacientes de LES de estudiados.

Las frecuencias estimadas de los alelos nulos del factor C4(**C4AQ0** y **C4BQ0**) en el grupo de enfermos y controles se muestra en la tabla 18. En contraste con lo descrito en otras poblaciones, el alelo C4AQ0 no aparece aumentado en el grupo total de enfermos de lupus ni en el grupo GNPd+ o en el GNPd-. Las frecuencias de los alotipos no nulos C4A y C4B no presentan desviación en el grupo de LES frente a controles (datos no mostrados).

Cuando se considera la existencia de un alelo nulo ya sea C4AQ0 o C4BQ0 , se observa un incremento de estos en el grupo de LES GNPd+ frente a GNPd- y frente a controles (Un 72% frente a un 36% y 72% frente a 59%, respectivamente) que no alcanza significación estadística (Tabla 18).

3.2.2. Distribución de genotipos C4 y 21-OH.

El análisis de los RFLP (Taq I/ sondas C4 y 21-0H, Apdo. 2.3.4 de Pacientes y Métodos) muestra que las deleciones en C4B y no en C4A tienen una mayor incidencia en el grupo de pacientes con GNPd cuando se comparan con el grupo control ($p=0.007$) (Tabla 19) Esto puede interpretarse como un posible reflejo del alto porcentaje del haplotipo extendido A30B18CF130DR3DQw2 el cual porta una deleción de C4B.

Además está significativamente incrementada la presencia de genes delecionados en C4 (ya sean C4A o C4B) ($p= 0.01$) en el grupo de individuos con daño renal (GNPd+)(Tabla 19).

ANTIGENOS HLA	GNPD+ n=22 (%)	GNPD- n=36 (%)	TOTAL n=58 (%)	CONTROLES n=69 (%)
A1	27	19	22	25
A2	31	33	32	52
A3	18	17	17	10
A23	9	8	9	3
A24	14	19	17	13
A25	4	3	3	4
A26	9	5	7	9
A11	14	8	10	19
A28	4	14	10	1
A29	9	5	7	17
A30	36	19	27	13
A31	-	-	-	4
A32	9	8	9	7
A33	9	-	3	7
A -	10	11	10	12
Cw1	5	-	2	7
Cw2	3	7	3	3
Cw3	10	12	7	10
Cw4	12	6	9	17
Cw5	50	17	29	25
Cw6	18	15	15	20
Cw7	40	32	34	31
Cw8	-	-	-	6
C-	60	50	53	70

TABLA 13.Frecuencias fenotípicas de los antígenos HLA-A,-B,-C,-DR y DQ en los grupos de LES y controles estudiados.

ANTIGENOS HLA	GNPD+ n=22 (%)	GNPD- n=36 (%)	TOTAL n=58 (%)	CONTROLES n=69 (%)
B7	23	22	22	10
B8	28	17	17	9
B44	9	19	15	26
B45	-	5	3	6
B13	4	3	3	4
B14	23	8	14	11
B62	9	3	8	10
B63	-	3	2	-
B38	4	5	8	3
B39	-	3	2	4
B57	9	8	9	4
B18	55	14	29	19
B49	4	5	8	6
B50	4	5	8	6
B22	-	-	-	10
B27	9	3	8	6
B35	23	17	19	11
B37	-	3	2	4
B60	4	3	3	1
B41	-	-	-	1
B56	4	3	3	-
B-	10	16	15	14

TABLA 13(cont). Frecuencias fenotípicas de los antígenos HLA-A,-B,C,-DR y DQ en los grupos de LES y el grupo control.

ANTIGENOS HLA	GNPD+ n=22 (%)	GNPD- n=36 (%)	TOTAL n=58 (%)	CONTROLES n=69 (%)
DR				
DR1	18	3	9	22
DR2	18	39	31	28
DR3	68	25	41	29
DR4	9	11	10	19
DR5	16	33	24	22
DR6	23	18	26	30
DR8	4	11	10	4
DR9	4	-	2	4
DR10	-	3	2	8
DR-	23	14	17	13
DQ				
DQ1	50	50	50	63
DQ2	19	15	15	60
DQ3	7	17	12	36
DQ-	28	23	24	37

TABLA 13(cont). Frecuencias fenotípicas de los antígenos HLA-A,-B,C,-DR y DQ en los grupos de LES y el grupo control.

ANTIGENOS	GNPD+	GNPD-	TOTAL	CONTROLES
HLA	n=22	n=36	n=58	n=69
	(%)	(%)	(%)	(%)
B8	14	25	21	10
B18	*55	14	29	19
Cw5	50	17	29	26
DR2	18	39	31	28
DR3	&68	25	41	29
(A30)B18DR3	\$41	8	21	9
(A1)B8DR3	13	16	15	10

(*)p=0,003 GNPD+ frente a controles;RR=5,2 δ =0,44 y p=0,001 GNPD+ frente GNPD-;RR=7,5 δ =0,47
(&)p=0,002 GNPD+ frente a controles;RR=5,2 δ =0,55 y p=0,001 GNPD+ frente GNPD-;RR=6,3 δ =0,57
(\$)p=0,001 GNPD+ frente a controles;RR=7,3 δ =0,34 y p=0,004 GNPD+ frente GNPD-;RR=7,6 δ =0,34

TABLA 14.Asociaciones serológicas (HLA-A, -B, -C y DR) significativas a Lupus Eritematoso Sistémico.

RFLP	GNPD+ n=22 (%)	GNPD- n=36 (%)	TOTAL n=58 (%)	CONTROLES n=69 (%)
DRB				
DR1	9	5	14	22
DR15	14	33	47	20
DRBr	-	-	-	1
DR16	-	-	-	-
DR17				
DR17.1	23	14	37	26
DR17.2	59	17	76	17
DR4	9	14	23	19
DR11	9	36	45	22
DR12	-	-	-	-
DR13a ¹	-	3	3	9
DR13a ²	-	-	-	-
DR13a ³	14	8	22	4
DR13a ⁴	4	8	12	4
DR13a ⁵	-	3	3	-
DR14b	-	-	-	-
DR13b	-	3	3	3
DR7				
DR7.1	14	17	31	22
DR7.2	18	14	32	7
DR8	9	14	23	4
DR9	4	-	4	4
DR10	-	-	-	9

TABLA 15. Frecuencias de los RFLPs de HLADRB, DQA y DQB en LES y grupo control.

RFLP	GNPD+ n=22 (%)	GNPD- n=36 (%)	TOTAL n=58 (%)	CONTROLES n=69 (%)
DQA				
DQ α 1a	18	8	12	30
DQ α 1b	18	36	29	26
DQ α 1c	14	17	15	16
DQ α 2	82	30	50	29
DQ α 3	36	42	40	48
DQ α 3b	4	28	19	23
DQ α 4	9	14	12	7
DQB				
DQ β 1a	27	19	22	37
DQ β 1b	18	39	31	31
DQ β x	4	-	2	1
DQ β 2a	82	30	50	29
DQ β 2b	22	22	22	27
DQ β 3a	9	42	29	23
DQ β 3b	9	42	29	23
DQ β 3c	-	-	-	1

TABLA 15 (Cont).Frecuencias de los RFLPs de HLADRB, DQA y DQB en LES y grupo control.

RFLP	GNPD+ n=22 (%)	GNPD- n=36 (%)	TOTAL n=58 (%)	CONTROLES n=69 (%)
DR1	9	5	&7	22
DR17				
DR17.1	27	14	19	26
DR17.2	*59	17	33	17
DQ α 1a	18	**8	&&12	30
DQ α 2a	\$82	30	50	29
DQ β 2a	\$82	30	50	29

(&)p=0,04 LES total frente a controles

(*)p=0,003 GNPD+ frente a GNPD-;RR=7,2 δ =0,51 y p=0,0008 GNPD+ frente a controles; RR=6,9 δ =0,51.

(**)p=0,02 GNPD+ frente a controles

(&&)p=0,02 LES total frente a controles

\delta=0,72 y p=0,00003 GNPD+ frente a controles; RR=10,2 δ =0,72

TABLA 16.Asociaciones significativas de los aloenotopos de DRB1, DQA1 y DQB1 y LES.

	GNDP+ n=22 (%)	GNDP- n=36 (%)	TOTAL n=58 (%)	CONTROLES n=69 (%)
Secuencias DQA1				
0101	14	*8	**10	39
0102	23	37	31	32
0103	14	17	16	19
0201	23	31	28	39
0301	18	14	16	32
0401	4	15	10	4
0501	\$77	67	69	48
Secuencias DQB1				
0501	18	17	17	30
0502	0	0	0	0
0503	0	0	0	0
0601	0	0	0	0
0602	18	40	31	20
0603	0	0	0	13
0604	0	0	0	0
0201	&76	48	59	51
0301	14	43	31	30
0302	14	9	11	10
0303	0	0	0	6
0401	4	0	2	1

(*) p= 0,0031 GNDP+ frente a controles.

(**) p= 0,027 LES total frente a controles.

(\$) p=0,029 GNDP+ frente a controles.

(&) p=0,02 GNDP+ frente a controles.

TABLA 17. Asociación de secuencias DQA1,y DQB1 y LES en el grupo estudiado.

	GNPD+ n=22 (%)	GNPD- n=36 (%)	TOTAL n=58 (%)	CONTROLES n=52 (%)
ALOTIPOS Bf				
F	31	39	36	40
S	82	86	84	86
F1	*41	14	24	11
S1	4	0	2	4
FENOTIPOS C4 NULOS (**)				
C4AQ0	23	33	27	34
C4BQ0	50	36	41	29
C4AQ0 ó C4BQ0	50	36	41	29
C4BQ0 C4BQ0	14	3	7	4

(*) $p=0,006$ GNPD+ frente a controles; $RR=5,3$ $\delta=0,34$

(**) Para las comparaciones de los alotipos de C4 $n=21$ GNPD+; $n=32$ GNPD- y $n=52$ controles.

TABLA 18. Distribución de frecuencias de los alotipos del complemento (Bf y C4) en el grupo de LES (GNPD+ y -) y en controles sanos.

	GNPD+ n=21 (%)	GNPD- n=32 (%)	TOTAL n=53 (%)	CONTROLES n=52 (%)
GENES C4				
C4A del	19	16	17	15
C4B del	&43	16	26	12
C4B short	67	72	70	71
C4B long	\$28	\$81	60	58
C4A del ó C4B del	^a 62	31	43	27
ALELOS NULOS C4 por delección				
C4AQ0 C4A del	100(4/4)	50(5/10)	64(9/14)	47(8/18)
C4BQ0 C4B del	.90(9/10)	38(5/13)	61(14/23)	43(6/15)
C4AQ0 C4A del ó	..93(13/14)	43(10/23)	62(23/37)	45(14/33)
C4BQ0 C4B del				

(&) p=0,007 GNPD+ frente a controles; RR=5,8 δ=0,35

(\$) p=0,004 GNPD+ frente a controles y GNPD- frente a controles

(^a) p=0,01 GNPD+ frente a controles

(.) p=0,01 GNPD+ frente controles y GNPD+ frente a GNPD-

(..)p=0,001 GNPD+ frente a controles

TABLA 19.Frecuencias de los genotipos del factor C4 y asociación a LES y /o sus grupos clínicos.

Respecto al tamaño de los genes C4B, C4B long aparece significativamente aumentado ($p=0.04$) en el grupo GNPD- y sensiblemente disminuido en los enfermos GNPD+ ($p=0.04$) cuando ambos se comparan con el grupo control.

Cuando se analizan las frecuencias de los alelos nulos CAQ0 y C4BQ0 (fenotipo), debidos a delección se observa que los más altos porcentajes de delecciones C4 ocurren en el grupo de LES con GNPD (90-100 %) comparado con los grupos GNPD-y LES total ($p=0.016$ y $p=0.0012$, respectivamente) donde solo aproximadamente un 50% de los alelos nulos se deben a delección mientras que el resto parecen ser pseudogenes.

3.3 Valores de la fracción etiológica (δ) y riesgo relativo (RR) en los diferentes marcadores de susceptibilidad a LES (Tabla 20).

Si consideramos la fracción etiológica δ como una medida del desequilibrio de ligamiento entre un marcador HLA y el locus de la susceptibilidad a la enfermedad o bien sus manifestaciones, observamos que los alelos HLA DQ α 2 y DQB2a son los marcadores genéticos más fuertemente asociados a la patología renal grave (GNPD) en el LES ($\delta=0.72$). El antígeno DR3 (DRw17.1 + 17.2) se asocian a este grupo en menor grado ($\delta=0.55$). El RFLP 17.2, el subtipo de DR3 más abundante de nuestra población presenta un valor de δ similar al de DR3 ($\delta=0.51$). Los antígenos de clase III asociados al grupo de LES con GNPD parecen ser marcadores genéticos más débiles de esta patología en pacientes españoles. Así, BfF1 y C4B del presentan la fracción etiológica más baja : $\delta=0.34$ y 0.35 respectivamente.(Tabla 20)

3.4 Asociaciones mas relevantes entre el sistema HLA y las manifestaciones del LES.

En la tabla 21 se muestran las frecuencias de las manifestaciones clínicas e inmunológicas características encontradas en el grupo de 58 pacientes estudiados. La patología renal es la más frecuente en el grupo estudiado, lo que coincide con lo descrito en la literatura (Tan y col, 1982). Esta descrito que aproximadamente el 70% de los pacientes de LES presentan nefritis en la autopsia. La pleuritis es una manifestación

	GNPD+ vs CONTROLES			GNPD- vs CONTROLES			GNPD+ vs GNPD-			TOTAL vs CONTROLES		
	p	RR	δ	p	RR	δ	p	RR	δ	p	RR	δ
SEROLOGIA												
Antigenos												
B18	3x10 ⁻³	5,2	0,44	NS			1x10 ⁻³	7,5	0,47		NS	
B18 DR3	1x10 ⁻³	7,3	0,34	NS			4x10 ⁻³	7,6	0,34		NS	
DR3	2x10 ⁻³	5,2	0,55	NS			1x10 ⁻³	6,3	0,57		NS	
BF1	6x10 ⁻³	5,3	0,34	NS			2x10 ⁻²	4,2	0,31		NS	
GENETICA MOLECULAR												
Alogenotopos												
DR17.2	8x10 ⁻⁴	6,9	0,51	NS			3x10 ⁻³	7,2	0,51		NS	
DQ α 1a	NS			2x10 ⁻²			NS				2x10 ⁻²	
DQ α 2	3x10 ⁻⁵	10,2	0,72	NS			4x10 ⁻⁴	11,0	0,72		NS	
DQ β 2a	3x10 ⁻⁵	10,2	0,72	NS			4x10 ⁻⁴	11,0	0,72		NS	
C4B del	7x10 ⁻³	5,8	0,35	NS			NS				NS	

TABLA 20. Comparaciones del riesgo relativo (RR) y la fracción etiológica (δ) entre los marcadores serológicos y genéticos (clase I, II y III) de susceptibilidad a LES.

relativamente frecuente (30-50% en otros trabajos) en LES y la afectación cardíaca (pericarditis), anemia hemolítica y afectación neurológica ocurren en baja frecuencia tanto en este estudio como en otros.

En cuanto a la incidencia de alteraciones inmunológicas, se destaca la presencia de anticuerpos antinucleares. Un 95% de los pacientes con LES poseen ANAs de título $> 1/80$ cuando son testados por IFI en secciones de hígado de rata o líneas celulares Hep-2. (Tabla 21) Un 19% de los pacientes poseen anticuerpos anti-dsDNA en suero. El título de estos anticuerpos es muy variable en los enfermos en función del grado de actividad de la enfermedad y se ha observado su aumento o descenso en función de la intensidad de determinadas manifestaciones clínicas de la enfermedad.

Las frecuencias de autoanticuerpos ENA se distribuyen de la siguiente forma: un 7% de LES son positivos para las especificidades RNP/Sm ; un 7% para SSb/La y un 31% poseen la especificidad SSa/Ro (Tabla 21). La frecuencia de anti-RNP/Sm esta muy disminuida con respecto a los valores encontrados en caucasoides aunque ya se ha descrito una menor incidencia de Anti Sm en poblaciones mediterráneas y otras de origen hispano en América del sur respecto a las del Norte de Europa y América. Las especificidades anti-Sm y RNP aparecen con mucha mayor frecuencia en lupus de raza negra que en blancos (Arnett y col., 1988) (ver también apartado 3.1.2. de Introducción).

La frecuencia de anti-Ro en este grupo de LES disminuye a un 15 % cuando los sueros de los pacientes son testados por la técnica de Inmunoblotting. Ello es debido a que hay un 50 % de los sueros anti-Ro no reactivos por Western Blot aunque son positivos en CIE. Ello confirma lo encontrado en otros estudios que consideran al Western Blot como una técnica que puede provocar la ruptura de la conformación nativa de la molécula cuyos epítomos son críticos para el reconocimiento por sueros anti Ro (Gilles B y col., 1991).

Los datos más recientes apuntan a que el antígeno diana Ro/SSa puede encontrarse al menos de cinco formas diferentes según el peso molecular de los polipéptidos que lo componen y su localización citológica. Los más abundantes son el compuesto por el polipéptido de 52Kd y el de 60Kd. La presencia de anticuerpos dirigidos contra ambos se

LES n=58 (%)

PLEURITIS	27
PERICARDITIS	12
AFECTACION NEUROLOGICA	12
ANEMIA HEMOLITICA	19
AFECTACION RENAL*	64

ANA+ >1/80 ENA ** 29
95% de los pacientes

TABLA 21. Frecuencia (%) de caracteres clínicos e inmunológicos (ANA) en 58 pacientes de LES.

(*) La afectación renal o glomerulonefritis (GN) en los enfermos se subdivide en: 38% **GNPD** (Glomerulonefritis proliferativa difusa); 12% **GN PF** (GN proliferativa); 10% **GN MES** (GN mesangial) y 3% **GN MEM** (GN membranosa).

(**) Las especificidades ENA se subdividen en los enfermos positivos de la siguiente manera: 7% **RNP/Sm**; 7% **La ó SSb** y 31% **Ro ó SSa**.

ha correlacionado con las 2 principales enfermedades en las que aparece la respuesta anti-Ro: LES y Síndrome de Sjögren (Ben-Chetrit y col., 1990). Las respuestas anti Ro determinadas por Western Blot en el grupo de LES estudiado son esencialmente frente a la partícula de 60 Kd de tal forma que un 44% de los anti-Ro positivo en CIE son anti Ro 60Kd mientras que sólo un 5% presentan anticuerpos anti-Ro 52 Kd junto a 60Kd y el 51 % restante son no reactivos en inmunoblot.

3.4.1. Asociación HLA y aspectos clínicos del LES

Cuando se estudian las frecuencias de los alelos HLA de clase I y II en relación a las diferentes manifestaciones clínicas de esta enfermedad se observan 2 asociaciones principales:

- Hay una fuerte asociación entre la Glomerulonefritis de tipo proliferativa difusa (GNPD) y los aloenotopos DR17.2 ($p=0.0004$;RR= 6.9; $\delta=0.51$), DQ α 2 ($p=0.00004$; RR=11.0; $\delta=0.75$) y DQ β 2a ($p=0.0002$;R.R= 7.0; $\delta= 0.63$). Todos estos alelos incluidos en el haplotipo extendido A30 B18 Cw5 BfF1 C4A3 BQ0 DR3 DQ2, descrito previamente (Apdo 3.1.b., Resultados) como principal marcador de susceptibilidad a LES y fundamentalmente cuando se estudia el grupo afecto de GNPD.

- La presencia de pericarditis, aunque constituye una de las manifestaciones clínicas menos frecuentes en LES (12% en el grupo estudiado) también está significativamente asociada a los aloenotopos DQ α 2 y DQ β 2a en el grupo de enfermos de LES. Un 100% (7/7) de los individuos que padecen pericarditis poseen el alelo DQ2.1 (DQ α 2,DQ β 2a) frente sólo un 39% de los que no la padecen (20/31)($p=0,003$. Esta asociación es significativa cuando se compara con el grupo total de LES, con un 50% de individuos positivos para los alelos DQ α 2/DQ β 2a ($p=0,01$).

El resto de las manifestaciones clínicas de esta enfermedad no parecen estar ligadas al sistema HLA en el grupo de LES españoles estudiado.

3.4.2. Respuesta de autoanticuerpos mediada por antígenos HLA clase II.

Inmunogenética de las respuestas anti ENA (anti-RNP/Sm y anti-Ro):

* RESPUESTA ANTI RNP/Sm

Al estudiar las respuestas de autoanticuerpos anti-ENA y su relación con el sistema HLA, sólo se encuentran 4 individuos positivos para las especificidades RNP/Sm, y todos ellos comparten el antígeno HLA DR17.2. que va asociado a DQ2 y a las secuencias DQA1*0501 y DQB1*0201.

* RESPUESTA ANTI-Ro/LA

En la tabla 22 se muestran las asociaciones de las respuestas de anticuerpos anti Ro y/o La y el sistema HLA encontradas en el grupo de los 58 LES. Podemos destacar:

1) El haplotipo HLA-B8DR3 aparece significativamente aumentado en el grupo de pacientes positivos para La/SSb que en todos los casos se acompaña de Ro, cuando estos se comparan con el grupo total de LES ($p=0.02$) o con el grupo de individuos sanos ($p=0.03$).

2) El alelo DR7.2 esta incrementado significativamente en el grupo anti Ro+La- cuando es comparada su frecuencia con controles sanos ($p=0,004$) De la misma manera, el RFLP DQB2b(DQB1*0201), en desequilibrio de ligamiento con DR7 esta aumentado en el grupo de LES Ro+ frente a LES Ro-. ($p=0.01$; R.R 5.6; $\delta=0.36$) y por ello la especificidad DQ2.2 (DR7) esta incrementada también significativamente cuando se comparan los grupos Ro+ y Ro- entre sí.

3) La respuesta anti-Ro no está relacionada con incremento significativo de DR3, DR17.1 ó 17.2 ni tampoco esta asociada significativamente a sus RFLPs asociados en DQ: DQB2a y DQ α 2. Por otra parte la asociación descrita en la literatura entre los heterocigotos HLA DQ1.2/DQ2.1 (en desequilibrio de ligamiento con DR2/DR3, respectivamente) y la respuesta anti-Ro no se confirma en el grupo de LES estudiado.

HLA	Ro+ n=18	Ro+La+ n=4	Ro solo n=14	Ro- n=40	LES n=58	CONTROLES n=69
DR1	22	0	28*	2	9	22
DR2(DR15)	28	0	35	25	26	20
DR3(DR17)	50	75	43	55	53	42
17.1	22	25	21	17	19	26
17.2	27	50	21	35	33	17
B8DR3	22	75**	7	12	15	12
B18DR3	11	25	14	25	21	10
DR7	50	50	50	22	30	29
DR7.1	28	50	21	20	15	22
DR7.2	22	0	28&	12	15	7
DQw1.2(DQw6)	28	0	36	32	31	32
DQw2.1	50	75	43	55	53	42
DQw2.2	45\$	50	43	12	22	26
DQβ 2b	44\$\$	50	43	12	22	27
DQw1.2/ DQw2.1	11	0	14	10	10	5
DQA*0501	72	100	64	67	69	48
DQB*0201	80 ^a	100	71	52	62	50

(*) p=0,04; RR=4,1; δ =0,17 LES Ro+ solo frente a LES totales;

p= 0,01; RR=19; δ : 0,26 LES Ro+ solo frente Ro-.

(**) p= 0,02; RR= 17,2; δ = 0,70 LES Ro+ La+ frente a LES total;

p=0,01; RR= 22; δ = 0,71 LES Ro+ La+ frente controles.

(&) p=0,04; RR=5,2; δ = 0,2 LES Ro+ solo frente a controles.

(\$) p= 0,01; RR= 5,3; δ = 0,42 LES Ro+ frente a LES Ro-.

(\$\$)p= 0,01; RR= 6,4; δ = 0,41 LES Ro+ frente a LES Ro-.

(^a) p= 0,02; RR= 4; δ = 0,6 LES Ro+ frente a controles.

TABLA 22. Antígenos HLA y su asociación a la producción de anticuerpos antiRo y/o La en un grupo de LES comparado con controles.

4) Cuando se calculan las frecuencias de las diferentes secuencias DQA1 y DQB1 asignadas a los genotipos determinados por RFLPs en los individuos Ro+) (Tabla 21), sí se observa un incremento de las frecuencias de DQA1*0501 y de DQB1*0201 (que definen el alelo DQ2.1) entre los productores de anti Ro. De ellas solo la secuencia DQB1*0201, compartida por las especificidades DR3 y DR7 está incrementada significativamente entre los pacientes de LES con Ro+ cuando se compara con su frecuencia en controles sanos ($p=0.02$; $RR=4$; $\delta=0.8$). Esta secuencia se encuentra entre las descritas como implicadas en la predisposición a la producción de anti-Ro en la hipótesis postulada recientemente por Reveille y col. (Reveille y col, 1991).

Respuesta de autoanticuerpos y manifestaciones clínicas del LES

La respuesta anti SSb/Ro correlaciona significativamente ($p=0.014$) con la ausencia de daño renal en los enfermos de LES estudiados, confirmando así lo encontrado por otros autores (Wasicek y col, 1982).

No se encuentra una asociación significativa entre la producción de anti-dsDNA y la presencia de daño renal en los pacientes estudiados. Esta asociación definida por algunos autores (Khanduja y col, 1991) es difícilmente valorable ya que la presencia y el título de los anticuerpos a-DNA ds varia en el tiempo con las remisiones y activaciones de la enfermedad o aparece en algunos enfermos sólo transitoriamente.

3.5. Lupus Eritematoso Sistémico y/o sus manifestaciones en 10 familias con al menos un miembro afecto de LES.

Se determinó el genotipo HLA-A,-B,-C y DR en 10 familias, 71 individuos en total, mediante el análisis de la segregación de los diferentes haplotipos. Los pedigrees de las mismas se muestran en las figuras 20-23, junto con los haplotipos HLA deducidos a partir del tipaje familiar y genotipos HLA clase II determinados mediante RFLPs.

Asociación del sistema HLA a la herencia del LES o sus manifestaciones en el grupo de familias estudiado.

Dada la heterogeneidad del grupo de familias estudiado (2 familias multiplex; 3 familias mixtas con pacientes afectos de LES y otra conectivopatía u otra enfermedad autoinmune y 5 familias simplex, ver apartado 5.2 de Pacientes y Métodos) y la heterogeneidad de la enfermedad en sí, es complicado realizar una valoración en conjunto de la relación entre sistema HLA y la susceptibilidad a LES en estas familias. Tampoco puede realizarse un análisis global formal de la asociación de los antígenos HLA con las respuestas de autoanticuerpos o rasgos clínicos en enfermos o familiares de los mismos.

Sin embargo, pueden destacarse varios aspectos:

* Si consideramos el grupo de familias con más de un miembro afecto de LES o bien con un afecto de LES y otro caso de otra enfermedad autoinmune, (fig A y B), solo en 2 de estas familias (familias 2 y 3) (2/5), podemos establecer una relación directa entre el sistema HLA y la existencia de enfermedad autoinmune. El haplotipo HLA-DR3DQ2 es heredado y compartido por los enfermos y no por los sanos en ambas familias. En las 3 familias restantes, se observa la compartición de un haplotipo entre los afectos pero este también es portado por individuos sanos de la misma familia lo que indica que otros genes o factores externos no conocidos actúan en la determinación de aparición del LES.

* Cuando consideramos el conjunto de las 10 familias, la relación entre el sistema HLA y la posesión del "rasgo o carácter autoinmune" ("autoimmune trait") (definido por Bias y col., 1986, como la presencia de enfermedad autoinmune o bien autoanticuerpos en suero u otras manifestaciones de carácter autoinmune, aún sin clínica aparente), no hay una asociación homogénea. Sólo en 2 de las familias estudiadas (números 4 y 7), el mismo haplotipo HLA es compartido por los individuos enfermos y sanos pero con anticuerpos dentro de la familia, mientras que no es compartido por los familiares clínicamente sanos y en ausencia de autoanticuerpos.

Compartición de antígenos HLA entre los progenitores de familias con LES.

En el grupo total de familias estudiadas se observa una alta compartición de antígenos HLA entre los progenitores de las familias que cuentan al menos con un afecto

AL MENOS COMPARTEN UN ANTIGENO (%)

	Clase I	Clase II	Clase I+II
a) PAREJAS DE FAMILIAS CON LES (n=10)	60	60	70
b) PAREJAS CONTROL SANAS (n=31)	64	58	87

Las comparaciones entre los grupos a y b para HLA clase I y /o II son todas no significativas.

TABLA 23. Frecuencia de compartición de antígenos HLA entre progenitores de familias con afectos de LES y en controles sanos.

de LES. Esta circunstancia ya ha sido descrita por otro trabajo (Schur y col, 1983) y sugiere la existencia de un factor genético recesivo que podría determinar la aparición de LES u otra enfermedad o rasgo autoinmune dentro de una familia. En 7 de las 10 familias estudiadas los padres comparten al menos 1 antígeno HLA, en el 80% de ellas este alelo es de clase II (DR-DQ). Podemos destacar que la frecuencia de compartición de antígenos HLA entre padres es mayor en el grupo de familias "multiplex" o con incidencia de otras enfermedades autoinmunes frente al grupo de familias simplex: el 100% de las familias del primer grupo comparten antígenos mientras que solo en 2 de las 5 familias simplex hay compartición de antígenos entre padres.

Para valorar la posible relevancia de este hecho en la herencia del LES o del "carácter autoinmune", comparamos la frecuencia de compartición de antígenos HLA entre los padres de familias con LES y un grupo de parejas sanas (n=31, Martín Villa y col, 1993). No se observa un incremento significativo de la frecuencia de compartición de antígenos entre progenitores de familias con afectos de LES frente a la encontrada en padres de familias sanas ($p > 0.05$) (Tabla 23).

Respuesta de autoanticuerpos en familiares enfermos y sanos.

Un 32% de los familiares sanos poseen autoanticuerpos no organoespecíficos en suero frente a un 94% de los enfermos. Los anticuerpos son no organoespecíficos: ANAs positivos en IFI. No hay ningún caso de anti-DNA o ENA positivo entre los familiares sanos. Al dividir las familias en función del número de miembros afectos, hay una mayor incidencia en la presencia de autoanticuerpos en las familias multiplex (con más de un afecto) que en las simplex (40% frente a un 23%, $p > 0.05$). Este dato confirma una vez más la presencia en las familias del "carácter autoinmune".

Los individuos afectos de LES, excepto uno, presentan ANA positivo de título $> 1/80$. De los 13 afectos de LES, 5 presentan especificidad ENA: 3 SSa+ y 2 SSb/SSa + (Figura). La respuesta anti SSa y/o SSb se asocia al haplotipo DR3-DQ2 en 3 de los casos Ro+ (Figuras 20-23) y a DR2DQ1 en el restante, coincidiendo con las asociaciones a alelos HLA encontradas en el grupo de individuos de LES no relacionados.

n°ALELOS relevantes (DQA1,DQB1)	LES Ro+ n=18	LES Ro- n=40 (%)	CONTROLES n=69
0	0	2,5	11,5
1	5	14	13
2	*55	7	34
3	33	26	25
4	5	21	16
Al menos 1	100	60	80

(*) p=0,0004; RR=16; δ =0,51

TABLA 24. Análisis del efecto de dosis génica en la predisposición a la producción de anticuerpos anti-Ro en el grupo de 58 LES estudiado

DISCUSSION

La complejidad genética del LES tiene probablemente un gran paralelismo con su gran heterogeneidad en las manifestaciones clínicas y serológicas. Este hecho implica la necesidad del análisis de los factores genéticos que determinan la expresión de la enfermedad en diferentes subgrupos clínicos y serológicos más homogéneos con el fin de obtener resultados más concluyentes. Los hallazgos de este trabajo así lo apoyan.

1.CONTRIBUCION DEL SISTEMA HLA A LA SUSCEPTIBILIDAD A PADECER LES Y GNPD EN UN GRUPO DE PACIENTES ESPAÑOLES.

El estudio de la asociación del LES y el sistema HLA a nivel de fenotipo aporta como primer dato el incremento de la frecuencia del haplotipo extendido A30 Cw5 B18 BfF1 C4A3 C4BQ0 DR3 DQ2 entre los enfermos de LES cuando se comparan con controles. Este haplotipo es característico de la población española y otras poblaciones mediterráneas y se ha descrito asociado a enfermedades autoinmunes como la diabetes mellitus insulino dependiente en poblaciones del sur de Europa (Arnaiz-Villena, 1984) a diferencia de la asociación del haplotipo A1 Cw7 B8 BfS C4AQ0 C4B1 DR3 DQ2 a diabetes y otras enfermedades autoinmunes en poblaciones caucasoides del norte de Europa. Este último haplotipo también se ha descrito asociado a LES en caucasoides del norte de Europa (Howard y col, 1986) y a LES neonatal en nuestra población (Arnaiz-Villena y col, 1989).

El incremento del haplotipo A30 Cw5 B18 BfF1 C4A3 C4BQ0 DQ2 solo alcanza significación estadística cuando se analiza un subgrupo de los enfermos, el que padece **glomerulonefritis proliferativa difusa (GNPD)**, una afectación renal grave mediada por inmunocomplejos y una de las manifestaciones más graves y características del LES. De la misma manera, cuando se analizan las frecuencias de los RFLPs de los genes HLA de clase II (DRB) en el grupo total de enfermos, se observa que solo la frecuencia del subtipo de DR3, DR17.2 esta incrementado en el grupo de enfermos con GNPd. Ello sugiere

claramente que el aumento del antígeno DR3 se debe al incremento del subtipo DR17.2 y al haplotipo extendido donde está incluido este alelo (A30 Cw5 B18 BfF1 C4A3 C4BQ0 DR3 (DR17.2) DQ2).

El polimorfismo DRB TaqI/pRTV, pone de manifiesto diferencias entre los subtipos del alelo HLA-DR17 (DR3). Dado que se ha descrito que las secuencias codificantes de estos subtipos son idénticas (DRB1*0301) (Bodmer y col, 1989) las bandas características de cada alelo reflejan por tanto diferencias en las secuencias no codificantes del gen DRB1 (Segurado y col, 1991), secuencias reguladoras del gen DRB que junto a otras secuencias DQA y DQB características de cada haplotipo (Bignon y col, 1989, Wescott y col, 1987) pudieran estar implicadas en la susceptibilidad a enfermedad renal en pacientes afectados de LES en las diferentes poblaciones.

Aunque regiones no codificantes en HLA DRB1 pudieran ser determinantes en la susceptibilidad a enfermedad renal grave en LES españoles, es importante destacar el fuerte incremento de los RFLPs **DQ α 2/DQ β 2a** (que forman el alelo DQ β 2.1), en desequilibrio de ligamiento con DR3, en el grupo de GNPD. Si tenemos en cuenta que el valor de fracción etiológica (δ) nos permite valorar la fuerza relativa de la asociación de los diferentes alelos con la enfermedad, DQ α 2/DQ β 2a parecen estar asociados a el subgrupo clínico GNPD con la máxima fuerza dentro del haplotipo extendido A30 Cw5 B18 BfF1 C4A3 C4BQ0 DR3 DQ2 tal y como lo indica el mayor valor de δ (0,72) para esta asociación (Tabla 20). En otros estudios recientes de la asociación HLA LES se destaca el importante papel en la susceptibilidad a LES del locus DQ :

El estudio de Fronck y col, 1990 muestra que el principal alelo HLA asociado a afectación renal en pacientes con LES de origen caucasoide es HLA-DQ1, bien asociado a los haplotipos DR1 DQ β 1.1, a DR2 DQ β 1.2 ó al alelo DR2(DR16) asociado a la especificidad HLA-DQ β 1.AZH, de baja frecuencia. HLA-DQ β 1.2 y DQ β 1.AZH también están incrementados significativamente cuando se estudia un grupo de LES de raza negra. En un estudio multicéntrico llevado a cabo con pacientes de LES de diferentes razas y poblaciones (Bias y col, 1992) se determinaron los antígenos HLA a nivel de RFLPs y mediante la técnica de PCR-SSO, utilizando controles del mismo origen étnico y se encontró

un incremento significativo del alelo HLA-DQB*0602, secuencia en desequilibrio de ligamiento con DRB1*1501 (DR2), en pacientes con LES de origen negro y japoneses.

2.AUSENCIA DE CONCORDANCIA ENTRE MARCADORES HLA QUE DEFINEN LA SUSCEPTIBILIDAD A LES EN DIFERENTES POBLACIONES

Las diferencias encontradas entre estos recientes trabajos y el presente estudio así como las frecuentes contradicciones en los resultados que aporta la literatura respecto a la asociación HLA y LES podrían deberse a diferentes factores:

* Muchos autores han achacado el hecho de la falta de concordancia en los resultados entre estudios de la asociación del LES y el sistema HLA a los problemas inherentes al tipaje HLA serológico de los enfermos de LES (Apdo III.2, Pacientes y métodos, Dunckely y col, 1986) lo que podría provocar errores en la asignación de alelos HLA quizás relevantes en esta enfermedad. En este trabajo, la buena correlación entre el tipaje serológico y genético (Tabla 9) elimina esta posibilidad. Por otra parte, la falta de concordancia persiste entre análisis realizados con técnicas de tipaje de ADN (Fronek y col, 1990).

* Un aspecto muy importante es el hecho de que la gran heterogeneidad clínica de la enfermedad probablemente enmascara las posibles asociaciones con el sistema HLA. En muchos de los estudios no se subdividen los enfermos para el análisis en grupos homogéneos, bien sean clínicos o serológicos. Se han publicado escasos trabajos en la literatura donde se realice un análisis comparativo entre los enfermos de LES afectados de patología renal, muy frecuente y homogénea desde el punto de vista inmunopatológico en LES. Además la valoración de la nefritis no es homogénea en los diferentes estudios. Así, en el presente estudio los enfermos son clasificados en función de los resultados de la biopsia mientras que otros trabajos (Fronek y col,1990) clasifican los enfermos con afectación renal solamente en función de criterios clínicos.

* Una selección muy estricta del **origen étnico o poblacional** de los enfermos estudiados al igual que de los controles, resulta ser un factor muy importante. Así lo avalan

numerosos trabajos. Schur y col, destacan la importancia de la etnia en la asociación del sistema HLA y la aparición de LES en su análisis (Schur y col, 1990). Estos autores no encuentran ninguna asociación entre el sistema HLA y la enfermedad cuando estudian un grupo poblacional mixto de enfermos de LES procedente mientras que cuando se construyen grupos étnicos y/o poblacionales homogéneos y las frecuencias antigénicas se comparan con controles de procedencia equivalente, se incrementan significativamente las frecuencias de alelos descritos previamente asociados a LES: De esta forma, los enfermos caucasoides de origen norte europeo (inglés e irlandés) presentan un incremento significativo de la frecuencia del haplotipo A1 Cw7 B8 BfS C4AQ0 C4B1 DR3 DQ2 mientras que la enfermedad no parece asociarse al sistema HLA cuando se analiza un grupo de pacientes de origen norteamericano, probablemente debido a la gran heterogeneidad étnica del grupo estudiado.

* La asociación diferencial del LES, o otras enfermedades autoinmunes como diabetes, a 2 haplotipos HLA extendidos diferentes en diferentes poblaciones : A1 Cw7 B8 BfS C4AQ0 C4B1 DR3 DQ2 en norte europeos y A30 Cw5 B18 BfF1 C4A3 C4BQ0 DR3 DQ2 en países mediterráneos podría indicar una posible relevancia funcional de las diferentes regiones de ADN no codificantes del alelo DR3 de los dos haplotipos en relación con la asociación a la enfermedad. Podría ocurrir que los **diferentes factores ambientales**, en las distintas localizaciones geográficas, determinaran la asociación del LES a diferentes alelos HLA. De esta manera la asociación diferencial de LES neonatal a A1 Cw7 B8 BfS C4AQ0 C4B1 DR3 DQ2.. en vez de a A30 Cw5 B18 BfF1 C4A3 C4BQ0 DR3 DQ2.. en nuestra población podría explicarse por la falta de susceptibilidad del feto a los mismos factores ambientales determinantes de la enfermedad en adultos. Esta posibilidad debe ser investigada y no podrá ser desvelada hasta que los mecanismos moleculares que determinan finalmente la asociación de los alelos HLA y la enfermedad puedan definirse con más exactitud.

Por otra parte, Dawkins (Cameron y col., 1992), destaca lo frecuente de la asociación de particulares haplotipos extendidos, más comunes en la población, a enfermedad. Este autor postula que los **haplotipos más comunes** en la población son **altos respondedores no específicos**, lo que implicaría que una alta respuesta inespecífica de

anticuerpos por parte de los portadores de dichos haplotipos podría conducir finalmente a enfermedad autoinmune produciéndose así una implicación directa de el haplotipo extendido (sea cual fuere) en la susceptibilidad a enfermedad. En este sentido, otros estudios de asociación HLA-enfermedad confirman que la asociación diferencial de distintos alelos en distintas poblaciones es un mero reflejo de la diferente distribución de frecuencias de los haplotipos o alelos HLA en las mismas. Así, la AR se asocia a DR4 en poblaciones caucasoides del norte mientras se asocia a DR1 y o DR10 en poblaciones mediterráneas. La teoría del epítipo compartido (Gregersen y col., 1987) puso de manifiesto la implicación en la enfermedad de secuencias comunes a los diferentes alelos que se encuentran asociados en las diferentes poblaciones.

* Otro planteamiento consiste en buscar elementos comunes situados en los loci HLA asociados a LES entre las diferentes poblaciones. Así, observamos, por ejemplo que el alelo DQ2, fuertemente asociado a LES con nefritis en la población española, es un alelo común a los dos haplotipos extendidos A30 Cw5 B18 BfF1 C4A3 C4BQ0 DR3 DQ2 y A1 Cw7 B8 BfS C4AQ0 C4B1 DR3 DQ2 y por tanto un buen candidato a marcador de susceptibilidad de la enfermedad. Sin embargo, como se ha citado anteriormente, cuando se estudian las diferentes poblaciones o se realiza un análisis genético más preciso de las especificidades HLA, se encuentra una falta de concordancia en las secuencias HLA de clase II asociadas a LES . Así Fronck y col, (Fronck y col, 1990) encuentran que el alelo de baja frecuencia DQB1.AZH, confiere el mayor riesgo relativo a padecer nefritis entre los enfermos de LES de origen caucasioide (RR=14), así como un incremento significativo de las secuencias DQB1 asociadas con los subtipos de DQB-DQ1: DQB1.1(DQB*0501); DQB1.2 (DQB1*0602) en el grupo de LES con afectación renal. El alelo DQB 2a correspondiente a la secuencia DQB1*0201, incrementada en nuestro grupo de LES con GNDP, no comparte ninguno de los aminoácidos relevantes de las 3 regiones hipervariables del exón 2 de la cadena DRB (sitios más polimórficos), con las secuencias de la especificidad DQB-DQ1, asociadas a la afectación renal en el grupo de LES de origen caucasioide.

Sin embargo, en este punto, tiene interés destacar los resultados de trabajos recientes en los que se ha detectado un nuevo nivel de polimorfismo en las secuencias

promotoras de los genes HLA de clase II DRA, DRB y DQB. Este polimorfismo parece implicar fundamentalmente una diferente expresión de los distintos alelos HLA (Perfetto y col., 1993) ya que los sitios polimórficos en las secuencias promotoras se localizan en lugares claves en la transcripción de proteínas (expresión de antígenos DRB y DQB) y por tanto podría traducirse en diferencias funcionales entre alelos HLA. Así, las diferencias alélicas podrían estar relacionadas con la expresión de moléculas de clase II en tejidos de expresión inducible de moléculas DR-DQ, hecho que se ha relacionado con la autoinmunidad. Cuando se secuencian diferentes alelos HLA-DQB (Andersen y col., 1991), se pueden agrupar las secuencias DQB correspondientes a los alelos DQ1.2, DQ1.1(DQB1*0501) y DQ2(DQB1*0201), en un grupo de alelos que comparten secuencias génicas promotoras comunes frente a otros alelos HLA-DQ como DQ3 y DQ4. Estos hallazgos sugieren la posibilidad de que un locus génico activamente implicado en la susceptibilidad a nefritis lúpica pudiera ser la región promotora de los genes HLA-DQB más que otras regiones expresadas en el primer dominio (exón 2) de la proteína y por tanto se podría hablar de "epítomos comunes" implicados en la susceptibilidad a nefritis en lupus entre poblaciones de diferente origen.

3.FACTORES DEL COMPLEMENTO IMPLICADOS EN LA PATOLOGIA RENAL GNPD EN LES.

El análisis de los factores del complemento Bf y C4, apoya la implicación del haplotipo A30 Cw5 B18 BfF1 C4A3 C4BQ0 DQ2 en la susceptibilidad a nefritis en el grupo estudiado. El alelo **BFF1** podría estar implicado en el daño renal (M.Villa y col, 1986), o bien podría incrementarse en esta patología como marcador de otro locus de susceptibilidad localizado dentro del haplotipo citado.

Por otra parte, numerosos estudios han descrito que la proteína C4A es crítica en la solubilización y eliminación de inmunocomplejos (Gatenby y col, 1990), cuyo depósito en exceso conduce finalmente a daño renal. Sin embargo en el caso del LES hoy aún no está del todo clarificada la base fisiológica de la asociación descrita del LES al alelo nulo C4AQ0 y no a C4BQ0. Aunque algunos trabajos concluyen que C4A juega un papel más importante que el isotipo C4B en el aclaramiento de inmunocomplejos, debido a la mayor afinidad de

aquel por los grupos amino de los complejos antígeno-anticuerpo, otros trabajos sugieren que C4B podría estar implicado junto a C4A en mecanismos de activación de los factores de la vía clásica y podrían resultar deficitarios funcionalmente los individuos con cualquiera de los alelos nulos. (Briggs y col, 1991).

En el grupo de enfermos estudiados, no encontramos un incremento significativo de alelos nulos de C4A o C4B (ausencia de proteína C4A o C4B) entre los individuos LES con enfermedad severa mediada por inmunocomplejos (GNPD) frente a las frecuencias de estos alelos observadas en individuos normales. En cambio, se observa un incremento significativo de los alelos C4B delecionados cuando se estudian los genotipos de C4 (RFLP TaqI/pATA). Si realmente C4B resulta ser menos importante que C4A en el aclaramiento de inmunocomplejos, este resultado sugiere que el incremento de C4B delecionado en el grupo GNPD+ es un mero reflejo de la alta frecuencia del haplotipo A30 Cw5 B18 BfF1 C4A3 C4BQ0 DR3 DQ2 en este grupo de enfermos. El incremento significativo de los alelos nulos C4AQ0 ó C4BQ0 debidos a deleción génica y no a la falta de expresión en el grupo GNPD+ frente a controles confirma que la deleción génica más que la ausencia de la proteína es el marcador de daño renal en este grupo. Algunos trabajos muestran que no puede establecerse una correlación directa entre bajos niveles de C4 en plasma y presencia de alelos nulos en pacientes con LES (Briggs y col, 1991). Por tanto la deleción en el locus C4B podría ser marcador de otros genes vecinos implicados en la susceptibilidad a nefritis en el LES (HLA-DR3-DQ2-DQB*0201).

Por otra parte, la base molecular de los alelos nulos de C4B es más heterogénea que la de C4 (Partanen y col, 1989). La presencia del alelo nulo C4AQ0 está normalmente debida a deleción del gen mientras que alelos C4BQ0 pueden deberse a deleciones, fenómenos de conversión génica que resultan en una duplicación del locus C4A o bien a defectos en la transcripción o traducción del gen. Al estudiar las longitudes genéticas de los genes C4 en los enfermos de LES del presente trabajo, se observa un incremento de la forma C4Blong en el grupo de enfermos sin GNPD. C4Blong no se ha encontrado en desequilibrio de ligamiento con ningún haplotipo HLA en particular. C4Blong es la forma predominante de los genes "nulos" o pseudogenes C4B y gran parte de estos alelos C4BQ0 se pueden explicar por la existencia de una conversión génica en el

locus C4B que finalmente supone una expresión homoduplicada del locus C4A y una ausencia de gen C4B. De esta manera podría especularse para el incremento de C4Blong en LES DPGN-, que una doble dosis génica de C4A podría proteger frente a la GNPD en LES.

4.INMUNOGENETICA DE LAS RESPUESTAS AUTOINMUNES ANTI Sm/RNP Y Ro/La

La respuesta autoinmune de anticuerpos frente a las especificidades **RNP/Sm** parece estar determinada por varios factores genéticos. En primer lugar un factor genético inherente a la etnia negra que determina su elevada frecuencia en LES de origen negro y su baja frecuencia en caucasoides blancos (Arnett y col, 1988) y por otra parte su asociación al sistema HLA. Recientemente, Olsen y col (Olsen y col, 1993) han descrito la asociación de determinadas secuencias HLA-DQA y DQB a la producción de autoanticuerpos anti-Sm/RNP, implicando así a determinados aminoácidos de la molécula HLA, posiblemente críticos en su interacción con un "péptido autoantigénico"y un receptor de la célula T y finalmente en la presencia de autoanticuerpos específicos en el suero del paciente. La baja frecuencia de RNP y/o Sm en el grupo de LES estudiado (y en general en LES de nuestra población) no permite valorar la asociación HLA de esta respuesta autoinmune.

De la misma manera, la respuesta de autoanticuerpos frente a el antígeno **Ro y/o La** parece estar determinada por los alelos HLA de clase II. Los últimos estudios apuntan a que la susceptibilidad a la producción de anti Ro/La estaría situada en el locus HLA-DQ y no en DR y que secuencias génicas que codifican para los aminoácidos Gln 34 en DQA y Leu 26 en DQB serían las directamente implicadas (Reveille y col, 1991) en la respuesta autoinmune anti Ro en el LES. Esta hipótesis es válida en nuestra población ya que un 100% de los LES productores de Ro poseen al menos una de las secuencias susceptibles (Tabla 24). Aunque en el grupo de LES Ro+ estudiado es la secuencia DQB*0201 la que se asocia con más fuerza a la presencia de anti-Ro ($\delta=0.8$). Pero en este análisis no se observa un efecto de dosis génica en cuanto a la asociación de 1, 2, 3 ó 4 secuencias susceptibles a la producción de anti-Ro (Tabla 24). Este hecho puede reflejar la baja frecuencia de homocigotos HLA-DQ1,DQ2 en el grupo de productores de Ro, a diferencia de su elevada frecuencia descrita en otros trabajos. Este dato podría reflejar una

diferencia poblacional o simplemente la necesidad de ampliar el número de LES Ro+ estudiados.

A diferencia de otros estudios que postulan que los diferentes autoanticuerpos son finalmente los causantes de la expresión clínica del LES en sus diferentes formas (Harley y col, 1989), no se encontró correlación entre la presencia de autoanticuerpos anti-ENA y la aparición de manifestaciones clínicas específicas de LES. Con excepción del hallazgo de la correlación inversa de la producción de anti La y daño renal en LES, hecho confirmado por otros trabajos y que confiere a la especificidad SSb/La un papel protector del daño renal.

5. ESTUDIOS DE FAMILIAS MULTIPLEX

Aunque el análisis del reducido número de familias con múltiples casos de LES no nos permite obtener resultados concluyentes en cuanto a la herencia del LES, nuestras observaciones parecen apoyar lo postulado en otros estudios previos. Los antígenos HLA no necesariamente cosegregan con la enfermedad u otras manifestaciones inmunológicas relacionadas con la misma en las familias estudiadas. Parece plausible la hipótesis de que otro componente genético (Bias y col, 1986.) sea el responsable de determinar la aparición de la autoinmunidad en las familias y los genes HLA, serán los genes secundarios que en diferentes contextos poblacionales o ambientales finalmente modulen las manifestaciones clínicas (patología renal, por ejemplo) y serológicas (presencia de diferentes respuestas de autoanticuerpos) en el LES, definiéndose así subgrupos genéticos de la enfermedad.

CONCLUSIONES

1. La aplicación de técnicas de genética molecular al estudio de la asociación del sistema HLA al Lupus Eritematoso Sistémico (LES) nos permite definir marcadores más específicos que los definidos por las técnicas serológicas.
2. La susceptibilidad a daño renal grave, glomerulonefritis proliferativa difusa (GNPD) en el grupo de LES españoles, esta asociada al haplotipo A30 Cw5 B18 BfF1 C4A3 C4BQ0 DR3 DQ2 siendo el alelo definido por los RFLPs DQ α 2/DQ β 2a (DQ2) el más fuertemente asociado a esta patología.
3. Se encuentran elementos comunes de susceptibilidad a nefritis entre el haplotipo (A30) B18 DR3-DQ2 asociado a LES en españoles y otros haplotipos (A1) B8 DR3 DQ2, ó HLA-DR2/DR1 DQw1 asociados a LES en caucasoides del norte de Europa o de raza negra, respectivamente: a) el alelo HLA DQ2, fuertemente asociado a esta patología en nuestra población y común a los 2 haplotipos extendidos citados b) secuencias génicas promotoras reguladoras de la expresión de los genes HLA-DQB, compartidas por los alelos HLA DQB1*0201 (DQ2) y DQB1*0501 (DQ1), asociados a nefritis lúpica en nuestra población y otras poblaciones respectivamente.
4. Se determinan otros factores HLA asociados a nefritis lúpica diferentes según los grupos poblacionales estudiados. Se pueden destacar las diferentes secuencias intrónicas reguladoras no codificantes del gen DRB1 definidas mediante el polimorfismo DRB Taq I/pRTV1 que difieren entre los subtipos de HLA-DR17: 17.1 y 17.2 incluidos en los haplotipos A1 B8 DR3 y A30 B18 DR3 respectivamente. Este hallazgo sugiere que diferentes factores ambientales podrían determinar la asociación a distintos marcadores HLA en las diferentes zonas geográficas.

5. Se encuentra un incremento de la frecuencia de la delección del factor C4B del complemento en los pacientes de LES con daño renal grave (GNPD), aunque podría ser un reflejo del incremento del haplotipo A30 Cw5 B18 BfF1 C4A3 C4BQ0 DR3 DQ2. No se ha encontrado al alelo nulo C4AQ0, implicado como factor primario susceptible a LES y/ o la patología renal por GNPD lo que nos sugiere que su papel en la eliminación de inmunocomplejos puede haber sido sobreestimado.
6. El sistema HLA está implicado en la respuesta de anticuerpos anti-Ro/La en LES según este análisis y confirmando lo descrito en otras poblaciones, aunque no se observa un efecto de dosis génica sobre la influencia de determinadas secuencias aminoacídicas en la aparición de respuestas anti-Ro, como ha sido postulado por otros. La respuesta de anticuerpos anti-Sm/RNP, por su baja incidencia entre los LES de nuestra población no puede ser valorada desde el punto de vista inmunogenético.
7. Los datos obtenidos en estudios familiares, aunque preliminares, sugieren que otros genes distintos a HLA parecen estar implicados en la incidencia del LES y/o sus manifestaciones autoinmunes características dentro de una familia. Los alelos HLA no cosegregan necesariamente con el LES o sus manifestaciones clínicas o serológicas.
8. Se describen 2 nuevos RFLPs definidos por el polimorfismo de restricción Taq I:
 - a) Un RFLP de 11,8 Kb Taq I/pRTV1 que forma parte del patrón de restricción del alelo HLA-DR11 (DRB1*1101). Aunque posee una secuencia codificante en el exón 2 idéntica a DRB3*0201 podría tratarse de un nuevo subtipo de DR52b (DRB3*0201) con diferencias en otros exones o zonas no codificantes de los genes DRB.
 - b) Un RFLP de 2,65 Kb Taq I/pRTV1 que supone una banda extra asociada al patrón de restricción de HLA-DR15, con el que segrega en la familia. Los estudios genéticos preliminares sugieren que se trata de un alelo HLA-DRB1*1501 con un lugar de restricción extra en otros exones o zonas no codificantes de los genes DRB.

REFERENCIAS

- AHEARN JM, PROVOST TT, DERSH CA, STEVENS MB Y COL: Interrelationships of HLA-DR, MB and MT phenotypes, autoantibody expression and clinical features in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 25: 1031-1040, 1982.
- ALPER CA, RAUM D, KARP S, AWDEH ZL, YUNIS EJ: Serum complement "Supergenes" of the major histocompatibility complex in man (Complotypes). *Vox Sang* 45: 62-67, 1983.
- ANDERSEN LC, BEATY JS, NETTLES JW Y COL: Allelic polymorphism in transcriptional regulatory regions of HLA-DQB genes. *J Exp med* 173:181, 1991.
- ANDERSSON, G LARHARMAR D, WIDMARK E, SERVENIUS B, PETERSON PA Y RASK L: Class II genes of the human major histocompatibility complex. Organization and evolutionary relationship of the DR beta genes. *J. Biol Chem* 262:8748-8758, 1987.
- ANDO A, KAWAI J, MAEDA M, TSUJI K, TROWSDALE J Y INOKO H: Mapping and nucleotide sequence of a new HLA class II light chain gene, DQB3. *Immunogenetics* 30:243-249, 1989.
- ANSELL BM, Y ALBERT ED: Juvenil chronic arthritis, pauciarticular type. *Histocompatibility testing 1984*. Edited by ED Albert, MP Baur y WR Mayrr. Springer Verlag, pp368-374.
- ARNAIZ-VILLENA A, REGUEIRO JR, NIETO CUARTETO JA, ORDOÑEZ A, SERRANO RIOS M: HLA and complement (C4 and Bf) allotypes in Type I and Type II Spanish diabetics. En *Diabetes Mellitus. Recent Knowledge on aetiology, complications and treatment*. Editado por Baba S, Gould MK, Zimmet P). pp 39-48, Academic Press, 1984a.
- ARNAIZ-VILLENA A, GOMEZ REINO JJ, GAMIR ML, REGUEIRO JR, VICARIO JL, GOMEZ REINO JF Y COL: DR, C4, and Bf allotypes in Juvenil Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum.* 27: 1281-1285, 1984.
- ARNAIZ-VILLENA A, VAZQUEZ-RODRIGUEZ J, VICARIO JL, LAVILLA P, PASCUAL D, MORENO F Y MARTINEZ-LASO J: Congenital heart block immunogenetics. *Arthritis and Rheum.* 32:1421-1426, 1989.
- ARNETT FC, SHULMAN LE: Studies in familial systemic lupus erythematosus. *Medicine* 55: 313-322, 1976.
- ARNETT FC, HAMILTON RG, ROEBBER MG Y COL: Increased frecuencies of Sm and nRNP autoantibodies in American Blacks compared to whites with SLE. *J Rheumatol* 15:1773-1776, 1988.
- ARNETT FC, BIAS WB Y REVEILLE JD: Genetic studies in Sjögren's Syndrome and Systemic Lupus Erythematosus. *J of Autoimmunity* 2:403-413, 1989a.

- ARNETT FC, HAMILTON RG, REVELLE JD Y COL: Genetic studies of Ro (SSa) and La (SSb) autoantibodies in families with systemic lupus erythematosus and primary Sjögren's Syndrome. *Arthritis Rheum.* 32:413-419, 1989b.
- ARNETT FC: Immunogenetics of the connective tissue diseases. En *Molecular Autoimmunity* pp 33-50. Editado por Norman Talal. Academic press limited, 1991.
- AUFFRAY C, KORMAN A, ROUX DOSETO M, BONO R, STROMINGER J. : cDNA clone for the heavy chain of the human B cell alloantigen DC1: strong sequence homology to the HLA-DR heavy chain. *Proc. Natl. Acad USA* 79:6337-6341, 1982.
- AWDEH ZL Y ALPER CA: Inherited structural polymorphism of the fourth component. *Proc Natl Acad Sci* 77: 3576-3580, 1980.
- BELL, ESTESS P, ST JHON T, SAIKI R, WAITING DL, ERLICH HA Y MC DEVITT HO: DNA sequence and characterization of human class II major histocompatibility complex β chains from the DRB1 haplotype. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:3405-3409, 1985.
- BELT KT, CARROL MC Y PORTER RR: The structural basis of the multiple forms of human complement component C4. *Cell* 36:907-914, 1984.
- BEN-CHETRIT E, FOX RI, TAN EG: Dissociation of immune responses to the Ro 52 Kd and 60 Kd polypeptides in systemic lupus erythematosus and Sjögren's syndrome. *Arthritis and Rheum* 33:349-355, 1990.
- BENGTSSON B, THOMSON G: Measuring the strength of associations between HLA antigens and diseases. *Tissue antigens* 18:356-363, 1981.
- BERTRANS J Y BAUR MP: Insulin-dependent diabetes mellitus. En *Histocompatibility Testing 1984*. Albert ED, Baur MP y Mayr WR (eds) Berlin, Springer-Verlag, 1984, pp.348-358.
- BIAS WB, REVELLE JD, BEATY TH, MEYERS, ARNETT FC: Evidence of autoimmunity in man is a mendelian dominant trait. *Am J Human Genet* 39:584-602, 1986.
- BIAS WB, HOCHBERG R, Mc LEAN RH Y MACHAN C: systemic lupus erythematosus joint report. En Tsuji Aizawa M y Sasazuki (eds). *HLA 1991*. vol 1. Oxford University Press. pp 740-745, 1992.
- BIDWELL J Y JARROD E: HLA-DR allogenotyping using exon-specific cDNA probes and application of rapid minigel methods. *Mol Immunol* 23:1111-1116, 1986.
- BIDWELL J, BIDWELL E, LAUNDY GJ, KLOUDA PT Y BRADLEY BA: Allogentypes defined by short DQ α and DQ β cDNA probes correlate with and define splits of HLA-DQ serological specificities. *Mol Immunol* 24: 513-522, 1987.
- BIDWELL J: DNA-RFLP analysis and genotyping of HLA-DR and DQ antigens. *Immunol Today*

9:18-23, 1988.

BJORKMAN PJ, SAPER MA, SAMRAOUI B, BENNET WS, STROMINGER JL Y WILEY DC: The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of HLA class I histocompatibility antigens. *Nature* 328:512-518, 1987a.

BJORKMAN PJ, SAPER MA, SAMRAOUI B, STROMINGER JL Y WILEY DC: Structure of the human class I histocompatibility antigen HLA-A2. *Nature* 329:506-512, 1987b.

BODMER JF, MARSH SGE, ALBERT ED, BODMER WF, DUPONT B, ERLICH HA, MACH B, MAYR WR, PARHAM P, SASAZUKI T, SCHEREUDER GMT, STROMINGER JL y col: Nomenclature for factors of the HLA system, 1991. *Tissue Antigens* 39:161-173, 1992.

BODMER J, MARSH SGE, PARHAM P, ERLICH HA, ALBERT E, BODMER WF Y COL: Nomenclature for factors of the HLA system, 1989. *ISSUE ANTIGENS* 35:1-8, 1989

BROWN JH, JARDETZKY T, SAPER MA, SAMRONI PJ, BJORMAN PJ, WILEY DC. a Hypothetical model of the foreign antigen binding site of class II histocompatibility molecules. *Nature* 332. 845-850, 1988.

BROWN JH, JARDETZKY TS, GORGA JC, STERN LJ, URBAN RG, STROMINGER JL, WILEY DC: Three-dimensional structure of the human

class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature*:364:33-39, 1993

BUYON JP,: Complete heart block and antibodies to the SSa/Ro-SSb/La antigen-systems. *Clinical aspects of autoimmunity* 4:8-17, 1990.

CAMERON PU, MALLAL SA, MALLAL MAH, DAWKINS: MHC genes influence the outcome of HIV infection. Ancestral haplotypes with C4 null alleles explain diverse HLA associations. *Human Immunol* 29: 282-295, 1990.

CAMPBELL RD: The molecular genetics and polymorphism of C2 and Factor B. *British Medical Bulletin*. Vol 43 No 1:37-49, 1987.

CAMPBELL RD Y TROWSDALE J: Map of the human MHC. *Immunology Today* 14:349-350, 1993.

CARREIRA P, MATEO I, GARCIA G Y COL: Antibodies to extractable cellular antigens in spanish systemic lupus erythematosus (SLE) patients. *Clinical Rheumatol* 6:80-83, 1987.

CARROLL MC Y ALPER CA: Polymorphism and molecular genetics of human C4. *British Medical Bulletin*. Vol 43 No: 50-65, 1987.

CARROLL MC, CAMPBELL RD, PORTER RR: The mapping of 21-hydroxylase genes adjacent to complement component genes in HLA, the major histocompatibility complex in man. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:521-525, 1985a.

- CARROLL MC, PALSDOTTIR A, BELT KT Y PORTER RR: Deletion of complement C4 and steroid 21-hydroxylase genes in the HLA class III region. *EMBO journal* 4:2547-2552, 1985b.
- COHEN PL Y EISENBERG RA: *lpr and gld* single gene models of systemic autoimmunity and lymphoproliferative disease. *Annual Rev Immunol* 90:243-269, 1991.
- CORELL A, MARTIN-VILLA JM, MORALES P, DE JUAN MD, VARELA P, VICARIO JL, MARTINEZ LASO J, ARNAIZ VILLENA A: exon-2 nucleotide sequences, polymorphism and haplotype distribution of a new HLA-DRB gene: HLA-DRB6. *Mol Immunol* 28:533-543, 1991.
- DANILOVS J, TERASAKI PI, PARK MS, AYOUB G: B-lymphocyte isolation by trombin-nylon wool. In: Terasaki PI (ed). *Histocompatibility testing 1980*. UCLA Tissue typing laboratory, Los Angeles, pp 287-288, 1980.
- DAUSSET J: "Iso-leuco-agglutinins IV: Leucoagglutinins and blood transfusion. *Vox Sanguinis* 4:190-198, 1954.
- DAUSSET J: "Iso-leuco-anticorps". *Acta Haemata. (basel)* 20:156-166, 1958.
- DAUSSET J, IVANYI P E IVANYI D: Tissue alloantigens in humans: Identification of a complex system (HU-I). *Histocompatibility Testing 1965*. Munksgaard, Copenhagen: pp 51-62, 1965.
- DEAPEN DM, ESCALANTE A, WEINRIB L Y COL :A revised estimate of twin concordance in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 35:311-318, 1992.
- DUNCKLEY H, GATENBY PA Y SERJEANTSON W: DNA typing of HLA-DR antigens in Systemic Lupus erythematosus. *Immunogenetics* 24:158-162, 1986.
- FEINBERG AP Y VOGELSTEIN B: A Technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 132: 6-13, 1983.
- FIELDER AHL, WALPORT MJ, BATCHELOR JR Y COL: Family study of the MHC in patients with SLE: Importance of null alleles of C4A and C4B in determining disease susceptibility. *Br J Med* 286:425-428, 1983.
- FORMAN MS, NAKAMURA M, MIMORI T, GELPI C Y HARDIN J: Detection of antibodies to small nuclear ribonucleoproteins and small cytoplasmic ribonucleoproteins using unlabeled cell extracts. *Arthritis Rheum* 28:1356-1361, 1985.
- FREDRIKSON GN, TRUEDDSON L, SJOHOLM AG Y COL: DNA analysis in a MHC heterozygous patient with C4 complete deficiency-homozygosity for C4 deletion and C4 pseudogene. *Exp. Clin Immunogenet* 8:29-37, 1991.
- FRONEK Z, TIMMERMAN LA, ALPER C Y COL: Major Histocompatibility complex genes and

- susceptibility to SLE. *Arthritis Rheum.* 33:1542-1553, 1990.
- GERAGHTY DE, KOLLER BH, ORR HT: A human major histocompatibility complex class I gene that encodes a protein with a shortened cytoplasmic segment. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 9145-9149, 1987.
- GERAGHTY DE, WEI X, ORR HT, KOLLER BH: Human Leukocyte antigen F (HLA-F) : An expressed HLA gene composed of HLA class I coding sequences linked to a novel transcribed repetitive element. *J Exp Med* 171:1-18, 1990.
- GIBOFSKY AM, WINCHESTER RJ, PATARROYO M Y COL: Disease association of the Ia-like human molecule alloantigens: controlling patterns in Rheumatoid Arthritis and Systemic Lupus Erythematosus. *J Exp. Med.* 148:1728-1732, 1978.
- GILLES B, LOPEZ-LONGO JF, LAPOINTE S Y MENARD HA: Sera from patients with autoimmune disease recognize conformational determinants on the 60 Kd Ro/SSa protein. *Arthritis Rheum* 34:722-730, 1991.
- GLOBERMAN H, AMOR M, PARKER KL, NEW MI Y WHITE PC: Nonsense mutation causing steroid 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Invest* 82(1) : 139-144, 1988.
- GLYNNE R, POWIS SH, BECK S KELLY A, KERR LA Y TROWSDALE J: A proteasome-related gene between the two ABC transporter loci in the HLA class II region of the human MHC. *Nature* 353:357-360, 1991.
- GORSKI J, ROLLINI P Y MACH B: Structural comparison of the genes of two HLA-DR supertypic groups: the loci encoding DRw52 and DRw53 are not truly allelic. *Immunogenetics* 25:397-402, 1987.
- GREENWALD CA, PEEBLS CL, NAKAMURA RM: Laboratory test for antinuclear antibody (ANA) in rheumatic diseases. *Lab Med* 9:19-27, 1978.
- GREGERSEN PK, SILVER J, WINCHESTER RJ: The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 30: 1205-1213, 1987.
- GRUMET FC, COUCKELL A, BODMER JG Y COL: Histocompatibility antigens associated with SLE. A possible genetic predisposition to disease. *N Engl. J. med* 285: 193-196, 1971.
- HANSON IM, POUSTKA A Y TROWSDALE J: New genes in the class II region of the human major histocompatibility complex. *Genomics* 10:417-424, 1991.
- HARLEY JB, REICHLIN M, ARNETT FC Y COL: Gene interaction of HLA-DQ enhances autoantibody production in primary Sjögren's Syndrome. *Science* 232: 1145-1147, 1986.
- HARLEY JB Y REICHLIN M: Antibodies to Ro

- (SSa) and heterogeneity of SLE. *J of Rheumatol.* 14 (supl 13): 112-117, 1987.
- HARLEY JB, SESTAK AL, WILLIS LG, SHU MAN FU, HANSEN JA Y REICHLIN M: A model for disease heterogeneity in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 32:826-836, 1989.
- HASHIMOTO H, TSUDA H, MATSUMOTO T Y COL: HLA antigens associated with systemic lupus erythematosus in Japan. *J Rheumatol* 12:919-923, 1985.
- HAWKINS BR, WONG KL, WONG RWS Y COL: Strong associations between the MHC and SLE in southern chinese. *J Rheumatol.* 14:1128-1131, 1987.
- HAWKINS BR, SERJEATSON SW Y COL: Distribuyion and co-ocurrence of MHC clas I, II and III markers in southern chinese: implications for autoimmune disease. *Dis Markers* 6: 237-245, 1988.
- HERZOG C, WALKER C, MULLER W Y COL: Anti-CD4 antibody treatment of patients with rheumatoid arthritis: I. Effect in clinical course and circulating T cells. *J Autoimmunol* 2:627, 1989.
- HIROSE S, UEDA G, NOGUCHI K, OKADA T, SEKIGAWA I, SATO H: Requirement of H-2 heterozigosity for autoimmunity in (NZB X NZW) F₁ hybrid mice. *Eur J Immunol* 16:1631-1633.
- HIROSE S, OGAWA S, NISHIMURA H Y COL: Association of HLA-DR2/DR4 heterozigosity with SLE in japanese patients. *J Rheumatol* 15:1489-1492, 1988.
- HOCHBERG MC: The application of genetic epidemiology to systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 14:867-869, 1987.
- HOWARD PF, HOCHBERG MC, BIAS WB, ARNETT FC : Relationships between C4 null genes, HLA-D region antigens and genetic susceptibility to SLE in caucasian and black americans. *Am J Med* 81: 187-193, 1986.
- KANEOKA H, HSU KC, TAKEDA Y COL:Molecular genetic analysis of HLA-DR and HLA-DQ genes among anti-U1-70 Kd autoantibody positive connective tissue disease patients. *Arthritis Rheum.* 35:83-94, 1992.
- KAWAI J, ANDO A, SATO, NAKATSUJI T, TSUJI K, INOKO H: Analysis of DR2 antigens using DR gene transfer into mouse L cells. *J Immunol* 142: 312-317, 1989.
- KELLY A Y TROWSDALE J: Complete nucleotide sequence of a functional HLA-DP β gene and the region between the DP β 1 and DP α 1 genes: comparison of the 5' ends of HLA class II genes. *Nucleic Acid Res* 13:1607-1621, 1985.
- KELLY AP, MONACO JJ, CHO S Y TROWSDALE J: A new human HLA class II related locus, DM. *Nature* 353: 571-576, 1991a.
- KELLY AP, POWIS SH, GLYNNE R, RADLEY E,

- BECK S Y TROWSDALE J: Second proteasome-related gene in the human MHC class II region. *Nature* 353:667-668, 1991b.
- KENNETH HF, KENETH E, SACK: Rheumatic Diseases. Cap 36. pp 438-445. En *Basic and Clinical Immunology*. Ed por Stites DP, Stobo JD, Vivian Wells J, Appelton and Lange, 1989.
- comparison of the properties of the two classes C4A and C4B of the human complement C4. *EMBO J* 3:1819-1823, 1984.
- LAWLOR DA, ZEMMOUR J, ENNIS PD Y PARHAM P: Evolution of class I MHC genes and proteins : from natural selection to thymic selection. *Annu. Rev Immunol* 8:23-63, 1990.
- MARSH SGE Y BODMER J: HLA-DR and DQ epitopes and monoclonal antibodies. *Immunology Today* 10:305-312, 1989.
- MARTIN-VILLA M, ARNAIZ-VILLENA A, LINARES L, GOMEZ REINO JJ: Bf polymorphisms in Systemic Lupus Erythematosus patients of spanish descent. *Arthritis Rheum* 29: 932, 1986.
- MARTIN-VILLA M, DE JUAN MD, VICARIO JL, LUQUE I, ALVAREZ E, ARNAIZ VILLENA A:HLA class I, class II and class III antigen sharing is not found in couples with unexplained infertility. *Int J Fertil* 38:280-288, 1993.
- MARTINEZ LASO J, VICARIO JL, CORELL A, MARTIN-VILLA JM, MORALES P, LLEDO G, SEGURADO OG, DE JUAN MD Y ARNAIZ-VILLENA A: Comparison between HLA-DRB and DQ DNA sequences and classical serological markers as type I (insulin-dependent) diabetes mellitus predictive factors in the spanish population. *Diabetologia* 35: 475-481, 1992a.
- MARTINEZ-LASO J, VICARIO JL, CORELL A, MORALES P, REGUEIRO JR, ARNAIZ-VILLENA A: A new HLA-DQA1.RFLP allele (DQ α 3b) distinguishes between genes of DQw2-DR3 and DQw3-DR5 haplotypes. *Nucleic Acids Research* 12:4911, 1989a.
- MARTINEZ-LASO J, VICARIO JL, REGUEIRO JR, CORELL A, PAZ ARTAL E, ARNAIZ VILLENA A: Description of an HLA-DQA1 RFLP allele (DQ α 4) defining DQw4/DRw8 haplotypes. *Nucleic Acids Research* 10:4006, 1989b.
- MAUFF G, HUMMEL K Y PULVERER G: Properdin factor B (glycine-rich β -glycoprotein or C3 proactivator) polymorphism: genetic and biochemical aspects. First application to paternity cases. *Z.Imm Forsch* 150:327, 1975.
- MERRYMAN PF, GREGERSEN PK, LEE S, SIVER J, NUÑEZ-ROLDAN A, CRAPPER R Y WINCHESTER R: Nucleotide sequence of a DRW10 beta chain cDNA clone. Identify of the third D region with that of the DRw53 allele of the beta 2 locus and as the probable site encoding a polymorphic MHC class II epitope. *J Immunol* 140:2447-2452, 1988.

- MITTAL KK, MICKEY MR, SIGNAL DP Y TERASAKI PI: Serotyping for homotransplantation XVIII. Refinement of microdplet lymphocyte cytotoxicity test. *Transplantation* 6: 913-917, 1968.
- MÖLLER E, CARLSSON B, WALLIN J.: Implication of structural class II gene polymorphism for the concept of serologic specificities. *Immunol reviews* 85: 107-128, 1985.
- NEPOM GT: Disease markers and new therapeutics. *Rheum. Dis. Clin North Am.* 18, n°4:719-722, 1992.
- OLSEN ML, ARNETT FC Y REVEILLE JD: Contrasting patterns of MHC class II alleles associated with the anti-Sm and anti-RNP precipitin autoantibodies in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 36:94-104, 1993.
- ORR HT, ROBB RJ, LOPEZ DE CASTRO JA Y STROMINGER JL: The heavy chain of human histocompatibility antigen HLA-B27 contains an immunoglobulin-like region. *Nature* 282: 266, 1979a.
- ORR HT, LOPEZ DE CASTRO JA, PARHAM P, PLOEGH HL Y STROMINGER JL: Comparison of amino acid sequences of two human histocompatibility antigens HLA-A2 and HLA-B7: Location of putative alloantigenic sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76: 4395-4399, 1979b.
- PARTANEN J, CAMPBELL RD,: Restriction fragment analysis of non-deleted complement C4 null genes suggests point mutations in C4A null alleles, but gene conversions in C4B null alleles. *Immunogenetics* 30:520-523, 1989.
- PAYNE R, Y ROFFS MR: "Fetomaternal leukocyte incompatibility". *J Clin. Invest.* 37:1756-1759, 1958.
- PERFETTO C, ZACHEIS M, Mc DAID D, Y COL: Polymorphism in the promoter region of HLA-DRB genes. *Hum Immunol* 36:27, 1993
- PIRANI CL, POLLACK VE: Systemic Lupus erythematosus glomerulonephritis. *Immunological mediated renal diseases: criteria for diagnosis.* Edited by N Rose, New York and Basel, Marcel Dekker, 1978.
- PLOEGH HL, ORR HT Y STROMINGER: Major Histocompatibility antigens in the human (HLA-A, -B, -C) and murine (H-2K, H-2D) class I molecules. *Cell* 24: 287-292, 1981.
- REVEILLE JD, SCHROHENLOHER RE, RONALD TA, BERGER BO: DNA analysis of HLA-DR and DQ genes in American blacks with SLE. *Arthritis Rheum* 32: 1243-1251, 1989.
- REVEILLE JD, MAC LEOD MJ, WHITTINGTON K Y COL: Specific amino acid residues in the second hypervariable region of HLA DQA1 and DQB1 chains genes promote the Ro (SSa)/La(SSb) autoantibody responses. *J Immunol* 146:3871-3876, 1991a.
- REVEILLE JD, BIAS WB, MIRIAM J, MAC LEOD,

- SMALL D AND ARNETT FC: The molecular genetics of systemic lupus erythematosus (SLE) in mexican americans. *Arthritis Rheum* 34: S 138, 1991.
- ROLLINI P, MACH B, GORSKI J: Linkage map of three HLA-DR β chain genes: evidence for a recent duplication event. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. 82:7197-7201, 1985.
- ROUBINIAN JR, PAPOIAN R, TALAN N: Androgenic hormones moderate autoantibody responses and improve survival in murine lupus: *J Clin Invest* 59:1066-1070, 1977.
- ROYCHOUDHURY AK, NEI M: Human polymorphic genes :Worldwide distribution. New York, Oxford University Press, p 144, 1988.
- SAIKI RK, SCHARF S, FALOONA F, MULLIS KB, HORN GT, ERLICH HA Y ARNHEIM N: Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickel cell anemia. *Science* 230:1350-1354.
- SARGENT CA, DUNHAM L, TROWSDALE J Y CAMPBELL RD: Human major histocompatibility complex contains genes for the major heat shock protein HSP70. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 86:1968-1972, 1989.
- SCHNEIDER PM, CARROLL MC, ALPER CA, RITTNER CH, WHITHEAD AS, YUNIS EJ, COLTEN H: Polymorphism of the human complement C4 and steroid 21-hydroxylase genes. Restriction fragment length polymorphisms revealing structural deletions, homoduplications, and size variants. *J Clin Invest* 78:650-657, 1986.
- SCHLOSSTEIN L Y COL: High association of an HLA-A antigen, W27, with ankylosing spondylitis. *N Engl Med* 288:704, 1973.
- SCHUR PH, MEYER I, GAROVOY M Y COL: Associations between SLE and the new major histocompatibility complex: clinical and immunological considerations. *Clin Immunol Immunopathol* 24:263-275, 1982.
- SCHUR PH Y CARPENTER CB: Sharing of HLA haplotype by parents of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 26:1104-1110, 1983
- SEGURADO O, IGLESIAS P, MARTINEZ-LASO J, CORELL A, MARTIN-VILLA JM, ARNAIZ VILLENA A: Autoimmunogenic HLA-DRB*0301 allele (DR3) may be distinguished at the DRB1 non-coding regions of HLA-B8,DR3,Dw24 and B18,DR3,Dw25 haplotypes. 28:189-192, 1991.
- SHAW S, JHONSON AH, SHEARER GM: Evidence for a new segregant series of B-cell antigens that are encoded in the HLA-D region and that stimulate secondary allogeneic proliferative and cytotoxic responses. *J Exp Med* 152:565-579, 1980.
- SNELLER MC, STRAUSS SE, JAFFE ES, FLEISCHER TA Y COL: A novel

- lymphoproliferative/autoimmune syndrome resembling murine lpr/gld disease. *J Clin Invest* 90:334-341, 1992.
- SOUTHERN EM: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98: 503-517, 1975.
- SPIES T, SORRENTINO R, BOSS JM, OKADA K Y STROMINGER JL: Structural organization of the DR subregion of the human major histocompatibility complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:5165-5169, 1985.
- SPIES T, BRESNAHAN M, BAHRAM S, ARNOLD D, BLANCK G, MELINS E, PIOUS D, DE MARS R: A gene in the human major histocompatibility complex class II region controlling the class I antigen presentation pathway. *Nature* 348: 744-747, 1990.
- SPIES T Y DE MARS R: Restored expression of major histocompatibility class I molecules by gene transfer of a putative peptide transporter. *Nature* 351:323-324, 1991.
- SRIVASTAVA R, DUCEMAN BW, BIRO PA, SOOD AS, WEISSMAN SM: Molecular organization of the class I gene of human major histocompatibility complex. *Immunol Reviews* 84: 93-121, 1985.
- SRIVASTAVA R, CHORNEY MJ, LAWRENCE SK, PAN J, SMITH Z, SMITH CL, WEISSMAN SM: Structure, expression and molecular mapping of a divergent member of the class I HLA gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 84: 4224-4228, 1987.
- STEITZ JA, BLACK DL, GERKE V Y COL: Functions of the abundant U-snRNPs. En Birnstel ML (ed): *Structure and function of Major and Minor Small Nuclear Ribonucleoprotein particles*. Berlin, Springer-Verlag, 1988, pp 115-155.
- STENSZKY-V, KOZMA-L, SZEGED-G Y COL: Heterogeneity of SLE elucidated by cluster analysis: the influence of HLA. *J Immunogenetics* 13:327-340, 1986.
- STERN R, FU SM, FATINO M Y COL: Hereditary C2 deficiency: association with skin lesions resembling the discoid lesion of SLE. *Arth Rheum* 19:517-522, 1976.
- SVEJGAARD A, PLATZ P Y RYDER LP: Insulin-dependent diabetes mellitus. En *Histocompatibility testing 1980*. Terasaki PI (ED). UCLA Tissue Typing laboratory, Los Angeles, pp. 638-656, 1980.
- SVEJGAARD A Y RYDER LP: HLA genotype distribution and genetic models of insulin-dependent diabetes mellitus. *Ann Human Genet* 45: 293-298, 1981.
- TAN EG, COHEN AS, FRIES JF, MASI AT Y COL: The 1982 Revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 25: 1271-1277, 1982.
- TANIGAKI N Y TOSI R: The genetic control of human Ia alloantigens : a three loci model

- derived from the immunochemical analysis of "supertypic" specificities. *Immunol Reviews* 66: 5-37, 1982.
- TOKUNAGA K, INOTOK, AKAZA T Y COL: Haplotype study on C4 polymorphism in Japanese. Associations with MHC alleles, complotypes and HLA-complement haplotypes. *Immunogenetics* 22:359-365, 1985.
- THOMSON G, ROBINSON WP, KUHNER MK, JOE S, KLITZ W: HLA and insulin gene association with IDDM. *Genet Epidemiol* 6: 155-160, 1989.
- TROWSDALE J: Genetics and polymorphism: class II antigens. *British Med Bull* 43:15-36, 1987.
- TROWSDALE J, HANSON I, MOCKRIDGE I, BECK S, TOWNSEND A, KELLY A: Sequences encoded in the class II region of the MHC related to the ABC superfamily of transporters. *Nature* 348: 741-744, 1990.
- TROWSDALE J Y KELLY A: The human class II α chain gene $DZ\alpha$ is distinct from genes in the DP, DQ and DR subregions. *EMBO Journal* 4:2231-2237, 1985.
- VAN ROOD JJ, VAN LEEUWEN A Y ERNISSE JG: Leucocyte antibodies in sera from pregnant women. *Nature* 181: 1735-1736, 1958.
- VICARIO JL, MARTINEZ LASO J, CORELL A, MARTIN VILLA JM, MORALES P, Y COL: Exclusive HLA-DQ factors do not explain susceptibility to insulin-dependent diabetes. *Human Immunology* 31:134-138, 1991.
- WASICEK CA Y REICHLIN M: Clinical and serological differences between SLE patients with antibodies to Ro versus patients with antibodies to Ro and La. *J Clin. Invest.* 69:835-843.
- WATSON RM, LANE AT, BARNETT NK Y COL: Neonatal Lupus Erythematosus: A clinical serological and immunogenetic study with review of the literature. *Medicine (Baltimore)* 63:362-378, 1984.
- WHITE PC, NEW MI, DUPONT B: Structure of the human steroid 21-Hydroxylase genes. *Proc. Natl Acad Sci USA* 83:5111-5115, 1986.
- WILSON WA, PEREZ MC Y COL: Complete C4B deficiency in black americans with SLE. *J Rheumatol.* 15:1855-1858, 1988.
- WOODROW JC: Immunogenetics of systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.* 15:197-199, 1988.
- ZINKERNAGEL RM Y DOHERTY PC: Restriction of in vitro T cell mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semi-allogenic system. *Nature* 248: 701,74.

Presidente:
Dr. M. de la Fuente

Vocales:
Dr. J.R. Requero
Dr. M. Ortiz de Landaburi
Dr. J.J. Gomez Peino Camota

Secretario:
Dr. J.M. Martin Villa

Reunido, en el día de hoy, el Tribunal que se
encargó de examinar, para juzgar esta tesis doctoral,
concluyó por UNANIMIDAD calificarla

de APTO CUM LAUDE

Madrid, 3 de Noviembre de 1994

El Secretario del Tribunal:

J.M. Martin Villa