

11261
17
14

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
FACULTAD DE MEDICINA

ESTUDIO INMUNOGENETICO DE PACIENTES MESTIZOS MEXICANOS
CON ESCLERODERMA

T E S I S

Que para obtener el titulo de

MAESTRO EN CIENCIAS BIOMEDICAS (INMUNOLOGIA)

presenta

GILBERTO VARGAS ALARCON

Director de tesis: Dr. Julio Granados Arriola

México, D.F. 1991.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE GENERAL

	Pags.
I. RESUMEN.	6
II. INTRODUCCION.	
II.1 Sistema Principal de Histocompatibilidad.	9
- Genes clase I.	11
- Genes clase II.	13
- Genes clase III.	15
- Desequilibrio de Unión	18
II.2 HLA y enfermedad.	20
III. ANTECEDENTES:	
III.1 Etiopatogenia de la escleroderma.	24
III.2 Clasificación clinica de la escleroderma.	25
III.3 Genética de la escleroderma.	27
III.4 HLA y escleroderma.	30
- Participación de moléculas clase II.	31
- Participación de moléculas clase III.	33
III.5 Ruptura de cromosomas y HLA en escleroderma.	34
III.6 Autoanticuerpos y HLA en escleroderma.	34
IV. HIPOTESIS.	36
V. OBJETIVOS.	36

VI. MATERIALES Y METODOS.	
VI.1 Muestra.	37
VI.2 Tipificación de moléculas clase I y II.	37
VI.3 Tipificación de moléculas clase III.	44
- Factor B.	44
- Cuarto componente del complemento.	48
- Segundo componente del complemento.	50
VI.4 Análisis Estadístico.	52
VII. RESULTADOS.	55
VIII. DISCUSION.	87
IX. CONCLUSIONES.	94
X. BIBLIOGRAFIA.	96

INDICE DE TABLAS

Tabla	Titulo	Pag.
1	Anticuerpos antinucleares en familiares de pacientes con escleroderma.	29
2	Ruptura de cromosomas e intercambio de cromátides hermanas.	29
3	Antígenos del SPH asociados a escleroderma.	30
4	Reportes que no comprueban asociación.	31
5	Participación de antígenos clase II en escleroderma.	32
6	Participación de antígenos clase III en escleroderma.	33
7	Relación de autoanticuerpos con el HLA.	35
8	Comparación entre pacientes y controles. Locus A.	58
9	" " " " . Locus B.	58
10	" " " " . Locus DR Complotipos.	59
11	" " " " . Locus C4 Factor B.	59
12	Comparación entre familiares y controles. Locus A.	61
13	" " " " . Locus B.	61
14	" " " " . Locus DR.	62
15	" " " " . Locus C4 Factor B.	62
16	" " " " . Complotipos.	63
17	Comparación entre pacientes y familiares. Locus A.	63
18	" " " " . Locus B.	64
19	" " " " . Locus DR.	64
20	" " " " . Locus C4	65

	Factor B.	65
21	" " " " . Complotipos.	65
22	Comparaciones significativas en dos alelos de pacientes con escleroderma.	66
23	Comparaciones pacientes vs controles. Resumen.	69
24	" familiares vs controles. Resumen.	69
25	" pacientes vs familiares. Resumen.	69
26a	Haplotipos de los pacientes con escleroderma.	70
26b	Continuación.	71
27	Frecuencia de haplotipos extendidos o segmentos en pacientes y controles.	73
28a	Comparación de frecuencias genotípicas entre pacientes con escleroderma difusa y controles.	77
28b	Comparación de frecuencias genotípicas entre pacientes con síndrome de CREST, escleroderma localizada, síndrome de Reynolds y controles.	77
29	Haplotipos en los pacientes con escleroderma difusa.	78
30	Comparación de frecuencia de haplotipos extendidos o segmentos en pacientes con escleroderma difusa y controles.	80
31	Haplotipos en los pacientes con síndrome de CREST.	83
32	Haplotipos en los pacientes con escleroderma localizada y síndrome de Reynolds.	85

INDICE DE FIGURAS

Figura	Titulo	Pags.
1	Sistema principal de histocompatibilidad en el humano.	10
2	Estructura de las moléculas clase I y II.	12
3	Mapa de los genes clase II.	14
4	Estructura de la molécula de C4.	16
5	Variantes electroforéticas de factor B.	17
6	" " " C2.	17
7	" " " C4.	19
8	Arbol genealógico de familia con escleroderma.	56
9	" " " " " .	57
10a	haplotipos extendidos o segmentos en pacientes con escleroderma y controles.	74
10b	Continuación de la anterior.	74
11	Frecuencia de haplotipos extendidos o segmentos en el cromosoma base o en el homólogo de pacientes y familiares.	75
12	Frecuencia del haplotipo B35,DR5,SC31 en pacientes con escleroderma difusa y controles.	81
13	Frecuencia del haplotipo B5,DR4,SC31 en pacientes con escleroderma difusa y controles.	82
14	Frecuencia del haplotipo B17,DR7,SC61 en pacientes con escleroderma difusa y controles.	82
15	Comparación de frecuencias de haplotipos extendidos o segmentos en el cromosoma base y en el homólogo de pacientes con escleroderma difusa y síndrome de CREST.	86

I. RESUMEN

La escleroderma es una enfermedad del tejido conectivo, de etiología desconocida y multifactorial, asociada aparentemente a los antígenos del sistema principal de histocompatibilidad (SPH) en varias poblaciones del mundo. Los resultados encontrados hasta la fecha son sumamente heterogéneos ya que se han reportado asociaciones con los tres tipos de antígenos de este sistema (clase I, clase II y clase III). Dicha heterogeneidad está influenciada principalmente por el componente étnico de los pacientes.

Para poder establecer qué antígenos se encuentran asociados en la población mexicana, se estudiaron 41 familias mestizas mexicanas que tenían a un miembro afectado por la escleroderma. De cada familia se separaron los haplotipos presentes en el enfermo (haplotipos enfermos) de aquellos que no había heredado (haplotipos sanos), de tal forma que se tuvieron 82 haplotipos de enfermos y 51 haplotipos de sus familiares sanos. Estos grupos se compararon con 200 haplotipos obtenidas de 50 familias sanas no relacionadas.

Para la caracterización de haplotipos se determinaron los antígenos HLA-A, -B, -C, y -DR por la técnica de microlinfocitotoxicidad con un panel de más de 200 antisueros. Los complotipos (moléculas clase III) se determinaron por electroforesis de plasma (obtenido de sangre con EDTA) en gel de agarosa e inmunofijación con antisueros específicos para los factores B y C4 en tanto que los alelos de C2 se determinaron por electroenfoque en geles de poliacrilamida más un ensayo hemolítico funcional con eritrocitos de carnero sensibilizados.

El análisis estadístico se realizó por la prueba de chi-cuadrada y riesgo relativo por el metodo de Woolf.

Al analizar los alelos por separado en pacientes y controles, se encontró en los pacientes un aumento en las frecuencias del HLA-DR5 ($p=0.005$) y C4B*1 ($p=0.005$), además de un incremento significativo en la frecuencia del complotipo FC31 ($p=0.001$). De la misma manera en los pacientes,

las frecuencias del HLA-B16 ($p=0.01$) y del HLA-DR8 ($p=0.004$) se encontraron disminuidas de manera importante.

Al hacer la comparación entre familiares y controles, se encontraron aumentadas la frecuencias de los antígenos HLA-B53, -B17, -DR3 e importantemente del HLA-DR7, además del C4A*3, C4B*1, el complotipo FC31 y el segmento DR6,SC31. De la misma manera estuvieron disminuidas las frecuencias de los antígenos HLA-B16 y el HLA-DR8.

La comparación entre pacientes y familiares demuestra la importancia de dos antígenos que son el HLA-DR5 cuya frecuencia estuvo aumentada en los pacientes y el HLA-DR7 con frecuencia aumentada en los familiares ya que en cuanto a los demás alelos, todos presentan una frecuencia semejante en los dos grupos.

Debido a la existencia de subtipos clínicos de la enfermedad, se hizo pertinente el análisis de frecuencias genotípicas entre los controles y pacientes con los diferentes subtipos clínicos. En el grupo de pacientes con escleroderma difusa estuvieron aumentadas significativamente las frecuencias del HLA-DR5, del complotipo FC31, del alelo C4B*1 y del segmento B35,DR5, así como disminuidas las del HLA-B16 y del HLA-DR8. De la misma manera la frecuencia del HLA-DR5 también estuvo aumentada significativamente en los pacientes con escleroderma localizada. Por otro lado, en el síndrome de CREST sólo estuvo aumentada marginalmente la frecuencia del HLA-B53 y en el síndrome de Reynolds la frecuencia del alelo C4B*2. Lo anterior hace pensar en la participación del DR5 como marcador de la forma generalizada de la enfermedad.

Debido a la presencia de ciertos segmentos o pares de alelos en los pacientes, se decidió hacer el estudio por haplotipos o segmentos de haplotipo, con lo cual pudimos detectar la presencia de 5 haplotipo extendidos o segmentos en los pacientes con escleroderma, estos son:

- 1.- A2,B35,DR5,DQw3,DRw52,SC31
- 2.- A2,B5,DR4,DQw3,DRw53,SC31
- 3.- A1,B17,DR7,DQw2,DRw53,SC61
- 4.- ,DR1,DQw1,DRw53,SC31

5.- A1, DR3,DQw2,DRw52,SC31

Cabe señalar que los antígenos adquieren mayor importancia cuando se les considera como parte de uno de los anteriores haplotipos extendidos o segmentos, esto es notorio al analizar a los pacientes en general, así como por subtipos clínicos.

Los pacientes con la escleroderma difusa presentan básicamente 3 de los haplotipos extendidos o segmentos anteriores y son los marcados por el HLA-DR5, -DR4 y -DR7.

La presencia de haplotipos extendidos o segmentos en el cromosoma base y en el homólogo parece ser diferente según el subtipo clínico de la enfermedad, razón por la cual se comparó la frecuencia de estos haplotipos extendidos o segmentos en escleroderma difusa y en síndrome de CREST. Los resultados muestran que la frecuencia de los haplotipos extendidos en el cromosoma base es semejante en ambos grupos (43.1% vs 45.4%), sin embargo, la presencia de estos mismos haplotipos en el cromosoma homólogo es diferente (27.2% vs 9.0%) y por tanto, la presencia de haplotipos no extendidos también resulta diferente existiendo más de ellos en los pacientes con el síndrome de CREST que en los que presentan la escleroderma difusa (45.4% vs 29.5%).

Nuestros resultados demuestran que las frecuencias de algunos antígenos clase II como el HLA-DR5 se encuentran aumentadas en los pacientes con escleroderma, sin embargo, esto parece ser una consecuencia de su inclusión en alguno de los haplotipos extendidos o segmentos que finalmente confieren la susceptibilidad.

Un punto importante es la presencia de estos haplotipos extendidos o segmentos no sólo en uno de los cromosomas sino también en el cromosoma homólogo, lo cual podría estar en favor de la hipótesis de formación de moléculas híbridas en cis o trans que podrían formar una molécula clase II diferente a la normal y que pudiera llegar a presentar un péptido propio y de esta forma llevar al fenómeno autoinmune que caracteriza a esta enfermedad.

II. INTRODUCCION

EL SISTEMA PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD

El sistema principal de histocompatibilidad (SPH) está formado por un grupo de genes localizados en el brazo corto del cromosoma seis humano (6p21.3) (Fig 1). Este sistema abarca entre tres mil y cuatro mil pares de bases nucleotídicas y se ha podido localizar gracias a estudios de electroforesis pulsada en gel implicando una electroforesis de campo con el fin de estudiar megabases de DNA (36,57 y 79).

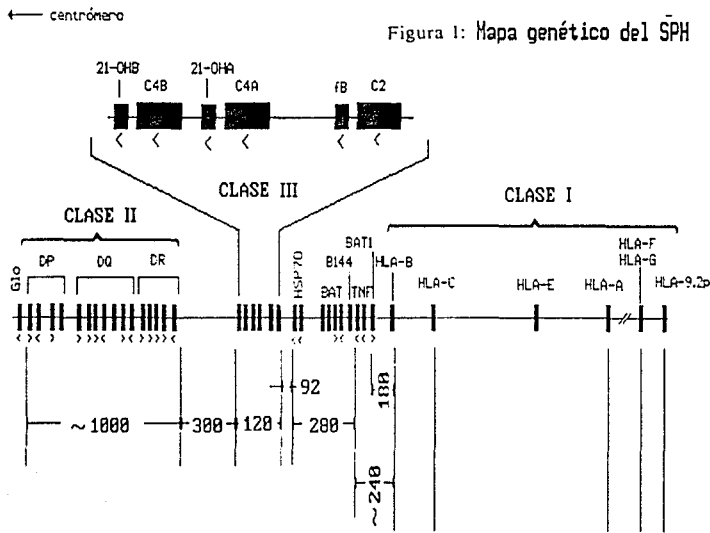
Hacia el telómero se encuentra la región clase I del SPH, que tiene por lo menos 17 genes relacionados entre sí (54) y que incluye los loci HLA-A, -B y -C. Hacia el centrómero está la región clase II, que se puede dividir en cuatro subregiones (DP, D0/DZ, DQ y DR), cada una por lo menos con un par de genes α y β (91). Dentro de la región de clase II se incluyen los determinantes HLA-Dw, los cuales se determinan por cultivo mixto de linfocitos (21). Entre las regiones clase I y clase II, se encuentra la región clase III, cuyos genes codifican para los componentes del complemento C2, factor B (fB), C4A y C4B, así como los genes estructurales de la 21-hidroxilasa A y B (21-OHA y 21-OHB):

Dentro del SPH se incluyen el gen de la glioxalasa I, el más centromérico de todos, los genes del factor de necrosis tumoral alfa y beta (TNF- α y TNF- β), que están entre el HLA-B y la región clase III y el gen de una proteína con estructura periódica no común llamada RD, que se encuentra entre el gen del factor B y el de C4A.

Recientemente se han encontrado otros cinco genes asociados al locus HLA-B, llamados "transcritos asociados a B", que son BAT-1, -2, -3, -4 y -5, así como también un gen llamado B-144 que es análogo a un gen con igual nombre que el del ratón (83). En 1989 se encontraron dos loci de la proteína de "choque térmico", HSP70-1 y HSP70-2, situados entre los genes de clase III y el del factor de necrosis tumoral alfa (79).

Los genes clase I, II y III se heredan de manera mendeliana codominante. Las moléculas clase I se expresan en la membrana de todas las células nucleadas del cuerpo, excepto en neuronas y trofoblastos maduros y son difíciles de detectar en eritrocitos. De los tres loci de clase I clásicos, HLA-A, -B y -C, el locus de C es el que menos adecuadamente se expresa. Las moléculas clase II se expresan sólo en ciertas células como macrófagos, linfocitos B, células endoteliales, células dendríticas y células de Langerhans. No se expresan en linfocitos T no activados, pero su expresión puede inducirse con mitógenos ó estímulos antígeno-específico. Ni los eritrocitos maduros ni los granulocitos expresan moléculas de clase II (31).

La frecuencia de recombinación genética dentro del SPH es muy baja (menos de 2 %) debido a que este conjunto de genes ocupa solamente unas 3,800 kb. El entrecruzamiento entre cromosomas homólogos que incluya a los genes HLA-A y -B ó a HLA-B y -DR ocurre con una frecuencia un poco menor de 1% del total de meiosis (8). Por esta razón el complejo génico puede considerarse como una sola unidad genética.



Los alelos de los loci del SPH de un cromosoma en particular constituyen un haplotipo (el genotipo de un individuo está dado por dos haplotipos, uno de origen materno y otro de origen paterno). Una combinación dada de alelos de los loci fB, C2, C4A y C4B forman un llamado complotipo (11) o haplotipo de genes del complemento.

a) Genes Clase I

Los antígenos de clase I son mediadores de la eliminación alogénica y de la restricción de linfocitos T efectoros (86). Se constituyen de un par de cadenas polipeptídicas unidas no covalentemente: una cadena pesada α , que es glicoproteica, transmembranal de 45 kd y una cadena ligera β , también glicoproteica, de 12 kd. La cadena α es polimórfica y es codificada por el HLA-A, -B ó -C y la cadena β , monomórfica, es la beta2-microglobulina, codificada por un gen en el cromosoma 15.

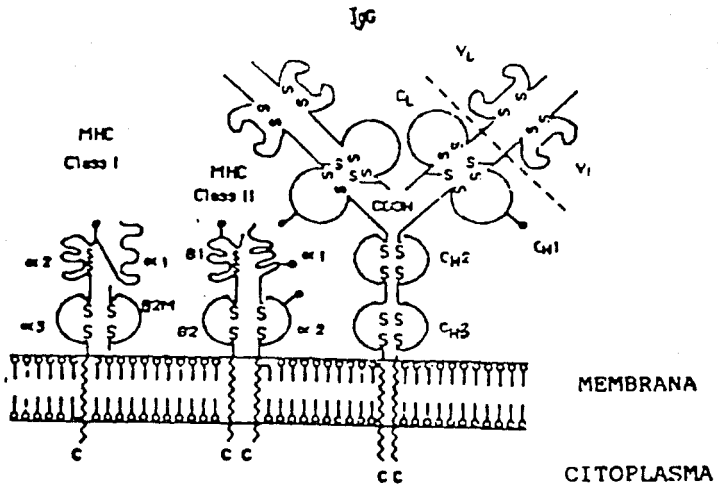
La estructura de los antígenos de clase I del SPH, se dedujo inicialmente a partir de la determinación de la secuencia de aminoácidos de material purificado de una línea celular humana linfoblastoide (87). Estas moléculas tienen dominios extracelulares, una región transmembranal y una cola citoplásmica corta (Fig.2). Se ha podido encontrar además la estructura tridimensional de una molécula clase I, el antígeno HLA-A2 por medio de cristalografía de rayos X (16). La cadena pesada α consta de tres dominios externos ($\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$). Los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ son los más distales a la membrana celular y son los que contienen los residuos polimórficos. Estos dos dominios conforman el sitio de unión a un antígeno (17), que es de esta forma presentado por la molécula del HLA al receptor del linfocito T.

Koller y colaboradores (1989) construyeron un mapa de los genes clase I, que incluye 6 loci: HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-A, HLA-F(5.4)/HLA-G(6.0) y HLA-9.2p. Abarca en total 11 cM (Figura 1).

El gen de la cadena α tiene ocho exones: el exón 1 codifica para el líder; el exón 2, para el dominio $\alpha 1$; el exón 3, para el dominio $\alpha 2$; el exón 4, para el dominio $\alpha 3$; el exón 5, para la región transmembranal y parte de la citoplásmica; los exones 6 y 7, para partes de la región intracitoplásmica y el exón 8, para la cola 3' no traducida (87).

La mayor diversidad de aminoácidos de los antígenos de clase I se halla en diferentes sitios en los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$, lo que se ha confirmado con experimentos de transfecciones génicas y por medio de reconocimiento con aloanticuerpos (86). El dominio $\alpha 3$ está muy conservado. El polimorfismo de estas moléculas es mayor que el de las regiones variables de las inmunoglobulinas y la mayoría de las posiciones polimórficas están en los residuos 1 al 194.

En el humano se han detectado por serología alrededor de 23 alelos del locus HLA-A, 49 de HLA-B y se estima que al encontrarse más subtipos de cada alelo, aumenten a 50 para HLA-A y a más de 100 para HLA-B (53).



MOLECULAS CLASE I Y II DEL MHC

b) Genes clase II.

Los antígenos de clase II son determinantes primarios en la generación de respuestas proliferativas de linfocitos T en cultivo mixto de linfocitos (87) y pueden presentar antígenos al receptor del linfocito T. Estas moléculas se encontraron como impurezas en preparaciones de antígenos de clase I. Se constituyen (fig. 2) de dos cadenas glicoproteicas, unidas no covalentemente, una pesada α monomórfica, de 33 kd y una cadena ligera β polimórfica, de 28 kd (91), ambas codificadas por loci del HLA. La molécula de clase II tiene cuatro dominios externos: $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$ y $\beta 2$, análogos a los dominios $\alpha 1$, $\alpha 3$, $\alpha 2$ y a la beta2-microglobulina, de la molécula de clase I, respectivamente. Los dominios $\alpha 2$ y $\beta 2$ son del tipo de los dominios de las inmunoglobulinas, muy conservados y los dominios $\alpha 1$ y $\beta 1$ son polimórficos. No se ha deducido la estructura tridimensional por cristalografía de rayos X, de las moléculas de clase II, pero se ha propuesto un modelo (25), parecido al de la estructura de la molécula de clase I.

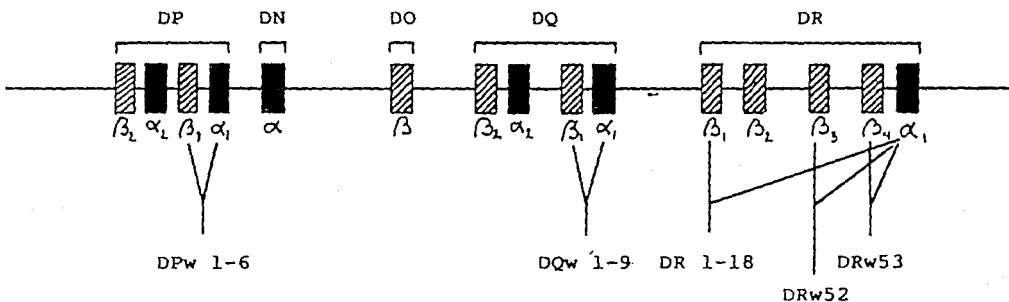
La molécula de clase II tiene asociada a las cadenas α y β una glicoproteína transmembranal de 31 kd, conocida como cadena gama o cadena invariante. Esta cadena no se detecta con anticuerpos en la superficie celular, por lo que se piensa que se disocia del complejo entre el paso por el aparato de Golgi y el arribo a la membrana celular (33).

De las cuatro subregiones de los genes de las moléculas de clase II (Fig. 3), la subregión DP consta de dos pares de loci α y dos β , de los cuales DP α 2 y DP β 2 parecen ser pseudogenes (genes que no codifican para proteínas). La subregión DZ/DO se constituye de los genes DZ α y D0 β , pero como estos dos loci están separados por varios cientos de kilobases, quizá no formen un dímero α/β (91). La subregión DQ tiene dos genes α y dos β : incluye dos genes DX (α y β) y un gen DV β entre los genes DQ y DX (19). La subregión DR tiene cuatro genes β : el $\beta 1$ codifica para las variantes de DR de DR1 al DR18, el $\beta 2$ es pseudogen, el $\beta 3$ codifica para el determinante DRw52 y el $\beta 4$ para el determinante DRw53. Hay un gen DR α no polimórfico. Se expresan tres tipos de productos de clase II: DP, DQ y DR. No hay evidencias de que DZ α y D0 β se expresen como proteínas, aunque se ha

encontrado ARNm normalmente poliadenilado, de ambos genes, en células B. Pueden formarse pares de cadenas DQ α y DQ β en "trans", es decir, la cadena α 1 y β 1 codificadas cada una por uno de los dos cromosomas homólogos de un individuo. También se pueden combinar productos de diferentes loci, como DR α y DQ β , en ratones transfectados (91).

Los genes de la cadena α de clase II tienen cinco exones: el exón 1 codifica para la región 5' no traducida; los exones 2 y 3, para los dominios α 1 y α 2; el exón 4, para el péptido que conecta una cadena con la otra, la región transmembral, la cola citoplásmica y parte de la región 3' no traducida; el exón 5 codifica para el resto de esta región (91). Los genes de la cadena β de clase II tienen seis exones, los primeros 5 son análogos a los exones de clase I, con la diferencia de que la cola citoplásmica se codifica por los exones 4, 5 y 6.

Figura 3: "SUBREGIONES" DE LA REGION HLA-D



El polimorfismo de las moléculas de clase II se encuentra en las cadenas β de los antígenos HLA-DP, -DQ y -DR. Los residuos polimórficos están en cuatro cúmulos en los dominios $\beta 1$ de DQ y DR, así como en un cúmulo en $\alpha 1$ de DQ. El polimorfismo de la cadena DP β es limitado (87).

El polimorfismo alélico de los antígenos de clase I y II se reconoce fenotípicamente por serología.

Las variantes de HLA-Dw se detectan por cultivo mixto de linfocitos. El polimorfismo genotípico se reconoce mediante secuenciación de nucleótidos y análisis de fragmentos de restricción (14).

c) Genes clase III.

Los genes de clase III del SPH, después del HLA, forman el conjunto de marcadores genéticos más polimórfico del humano (9). Los cuatro loci de esta región (C2, factor B, C4A y C4B) se heredan en bloque, pues al analizar varios centenares de meiosis informativas, se ha observado que no hay intercambios genéticos entre ellos (7,10).

Las moléculas de C2 y del factor B son glicoproteínas de una sola cadena de 102,000 y 90,000 Daltones, respectivamente y circulan en el plasma en forma de pro-enzimas (27). Se sintetizan en el hígado y en células de la línea monocito/macrófago. Ambas moléculas parecen tener tres dominios globulares.

La molécula de C4 (fig. 4), pesa 200 kd y tiene tres subunidades unidas por puentes disulfuro: α (95kd), β (75 kd) y γ (30 kd). Se sintetiza como una sola cadena en el orden β - α - γ que luego se glicosila y se procesa intracelularmente; se secreta como una estructura de tres cadenas (29).

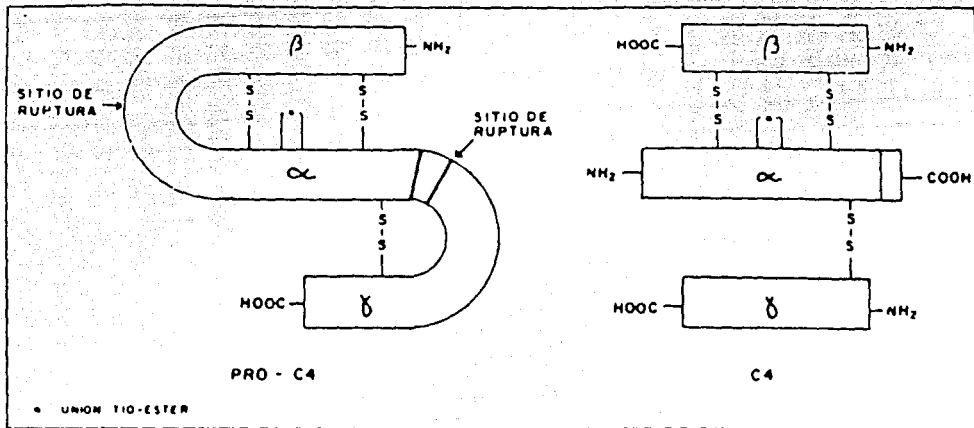


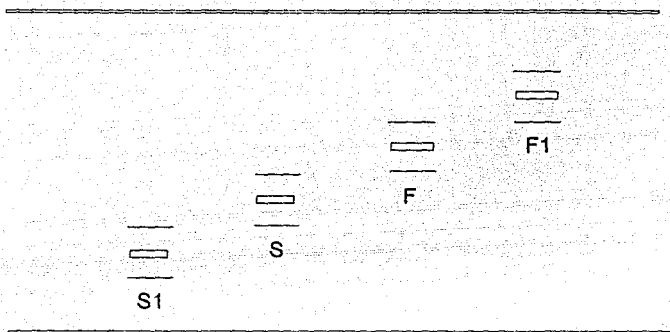
Figura Estructura de la proteína C4 en el suero humano. En el extremo izquierdo se representa la forma de pro C4, la cual dentro de la célula es procesada en forma proteolítica para dar lugar al trimero que se muestra en el extremo derecho.

La enzima 21-hidroxilasa es un citocromo P-450. Cuando está ausente total o parcialmente, provoca un defecto en el metabolismo esteroideo y causa entonces hiperplasia adrenal congénita. Se sintetiza en la glándula suprarrenal.

Se ha podido hacer un mapa molecular de los genes de clase III, gracias al aislamiento de clonas de cósmidos que los contienen y se ha establecido el orden relativo de los loci de C2, fB y C4. Esta región ocupa aproximadamente 120 kb. El orden de los genes, de centrómero a telómero, es 21-OHB, C4B, 21-OHA, C4A, fB y C2.

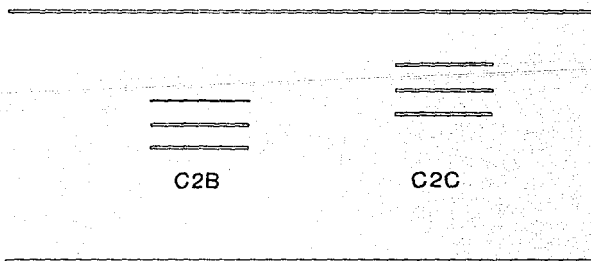
El gen del fB tiene dieciocho exones, caso semejante al del gen de C2. La organización de los exones del fB revela una relación estructural y evolutiva, a nivel de organización génica, entre esta proteína y otras proteasas de serina (27). Existen dos variantes principales de fB, detectadas por medio de electroforesis de plasma, en gel de agarosa, más inmunofijación: F y S. Existen dos variantes menores, F1 y S1 y catorce variantes muy raras (Figura 5).

Figura 5. Variantes electroforéticas del factor B.



En esta figura se muestran las cuatro variantes del factor B obtenidas por electroforesis de alto voltaje. Cada variante presenta un patrón de tres bandas una banda central gruesa y dos bandas más tenues localizadas en la parte superior e inferior de la banda gruesa.

Figura 6. variantes electroforéticas de C2.



Únicamente se muestran las dos variantes más comunes de C2 (C2B y C2C) constituidas cada una por un patrón de tres bandas.

Las variantes de C2 se pueden detectar mediante isoelectroenfoque de plasma o suero y un ensayo hemolítico. Los patrones de C2 constan de dos bandas prominentes de lisis y de dos o tres bandas adicionales ácidas o básicas. La variante común de C2 se llama C, la básica rara es B y la ácida, A (Figura 6) (7).

Hay dos loci para C4 en el humano (10). Producen proteínas similares que difieren serológica, estructural y funcionalmente entre sí. Los antígenos del grupo sanguíneo Chido y Rodgers se encuentran en los productos de los genes de C4B y C4A respectivamente. El polimorfismo estructural de C4 es mayor que el de C2 o fB y es el que proporciona el polimorfismo de los genotipos (29). Los alelos de cada locus de C4 se designan con números según la movilidad electroforética del cátodo al ánodo. El nombre de un alelo está dado por: nombre del locus, un asterisco y un número o el símbolo "Q0" si el alelo es nulo (10). (Figura 7).

Existen alelos nulos de C4A y C4B. Alrededor de la mitad resultan de pérdidas de ADN que incluyen a C4A y 21-OHA o a C4B y 21-OHA o a C4B y 21-OHB, no se ha visto pérdida de C4A y 21-OHB. Los alelos nulos que no se deben a pérdidas de ADN probablemente resultan de varios defectos en la transcripción o la traducción (29).

Los dos loci de la 21-hidroxilasa, 21OHA y 21-OHB, se encuentran en dirección 3' junto a los loci de C4A y C4B, respectivamente (28,94).

Se ha sugerido que los genes de la 21-hidroxilasa se duplicaron junto con los dos genes de C4. Sólo el locus 21-OHB es importante para la biogénesis de esteroides (29).

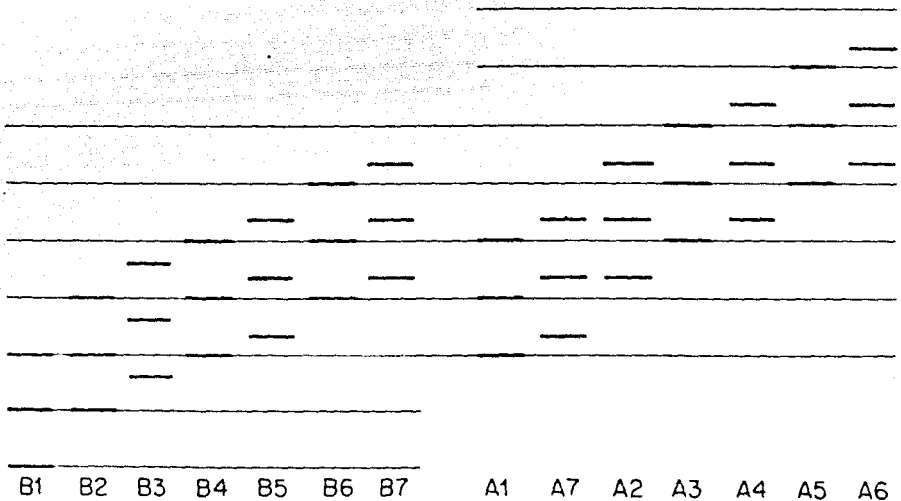
DESEQUILIBRIO DE UNION Y HAPLOTIPOS EXTENDIDOS

La frecuencia de los diferentes antígenos y haplotipos del SPH varía de una población a otra y algunos de ellos son característicos de ciertos grupos étnicos.

Pueden existir alelos de dos o más loci que se encuentran juntos con una frecuencia mayor a la esperada que si su asociación ocurriera al azar. Este fenómeno se llama desequilibrio de ligamiento o de unión y se presenta en el SPH (6). Esta es una característica del sistema HLA en todas las poblaciones estudiadas y es el fenómeno generalmente responsable de los haplotipos más frecuentes.

Como el desequilibrio de unión entre los loci del HLA se extiende a otros genes de la región, se forman haplotipos llamados extendidos que incluyen entonces a los genes clase I, II y III y al gen de la glioxalasa I. Se pueden observar tales grupos de ligamiento extendido al analizar haplotipos completos del SPH (6).

Figura 7: Variantes electroforéticas del cuarto componente del complemento.



ASOCIACION DEL HLA CON ENFERMEDADES

Los avances ocurridos en el conocimiento de la genética y la biología de las moléculas clase I, II y III han estimulado la investigación en el área de la asociación de enfermedades con alelos de estos genes, especialmente por el papel que tienen en la regulación de la respuesta inmunitaria. En otras palabras, se puede inferir que cualquier trastorno manifestado ya sea como aumento o defecto de la respuesta inmunitaria, es natural que involucre a cualquiera de los antígenos del SPH teniendo por lo tanto consecuencias relevantes en el tipo de respuesta inmunitaria que desarrolle un individuo en particular.

La asociación de los genes del SPH con enfermedades se demostró primero en ratones en el año de 1964; en aquella ocasión, se describió un tipo de leucemia inducida por virus asociada con el genotipo H2¹⁵ (equivalente murino del SPH). Esta asociación de un marcador genético con una enfermedad llevó entonces a buscar asociaciones entre los fenotipos HLA y enfermedades en los seres humanos.

En 1973 se reportó la asociación entre espondilitis anquilosante y el antígeno HLA-B27, desde entonces más de 50 enfermedades han sido descritas como asociadas con uno o más antígenos del SPH (89). Estas enfermedades se pueden incluir básicamente en tres grupos:

- 1.- Enfermedades asociadas a los antígenos clase I (principalmente las espondiloartropatías asociadas al B27).
- 2.- Enfermedades asociadas a los antígenos clase II principalmente con el locus HLA-DR.
- 3.- Enfermedades asociadas a los antígenos clase III.

La mayoría de las enfermedades incluidas en el segundo grupo son de origen autoinmune. Las enfermedades asociadas al SPH son multifactoriales, es decir, involucran tanto el terreno genético del individuo como también ciertos factores ambientales, actuando conjuntamente para influir en la susceptibilidad o resistencia al desarrollo de enfermedades específicas.

Es necesario distinguir el concepto de asociación con el de ligamiento. El ligamiento sólo puede ser identificado por estudios familiares que incluyan más de una generación, y de esta manera determinar si ciertos caracteres genéticos son transmitidos junto con el gen para la enfermedad a la descendencia. El término asociación, se usa para referirse a la relación entre dos caracteres o hallazgos que en principio no tienen conexión.

La mayoría de los estudios que tratan del papel del HLA en las enfermedades, se han realizado en población abierta e involucran padecimientos que generalmente no ocurren en más de un miembro de una misma familia. Tales estudios, han generado información importante concerniente a la prevalencia de ciertos antígenos HLA en forma aislada, y también han informado acerca de la frecuencia relativa de varios haplotipos HLA para una enfermedad en poblaciones diferentes.

Es factible, que el gen de susceptibilidad para una enfermedad esté dentro del SPH o que la enfermedad sea causada por genes recesivos, como ocurre en los casos de deficiencias de C2 y de C4 o en la hiperplasia adrenal congénita debida a la deficiencia del gen para la enzima 21-hidroxilasa. De la misma manera se ha demostrado un gen dentro del SPH que confiere susceptibilidad al desarrollo de hemocromatosis idiopática; en esta enfermedad, el poseer ambos haplotipos HLA en común con el caso índice, confiere mayor expresión bioquímica de sobrecarga de hierro y la aparición de síntomas clínicos que caracterizan a la enfermedad (13). Por otro lado, existen enfermedades como la ataxia cerebelosa en la que se han demostrado genes de susceptibilidad con forma de herencia dominante unidos al SPH.

La mayoría de las enfermedades estudiadas en relación con el SPH, muestran asociación, pero no se ha demostrado ligamiento; entre ellas cabe resaltar el caso de la espondilitis anquilosante con el B27, ya que esta asociación tiene uno de los riesgos relativos más elevados (>100) esta asociación se ha evidenciado en todas las poblaciones del mundo hasta ahora estudiadas.

Existen otras enfermedades asociadas ya sea con el HLA-DR3, HLA-DR4 o con el HLA-B8; entre ellas están la enteropatía por sensibilidad al gluten, en la que se ha encontrado que la respuesta inmunitaria a la gliadina es anormal; también en el caso de la diabetes insulino dependiente, se

encuentran anomalías inmunológicas, éstas incluyen anticuerpos contra las células de los islotes de Langerhans y trastornos de inmunoregulación; la enfermedad de Graves, está asociada con la producción de anticuerpos contra el receptor de la hormona estimulante del tiroides; y en la miastenia gravis, los pacientes desarrollan anticuerpos contra el receptor de acetilcolina. Una enfermedad que se encuentra asociada con alelos del locus DR, es la esclerosis múltiple en donde también existen trastornos inmunológicos, esta entidad neurológica está asociada con el HLA-DR2 (67). En individuos mexicanos, se ha descrito un incremento de la misma en aquellos que poseen el antígeno HLA-DR2 (46).

Existen por lo menos tres enfermedades en donde se ha estudiado con mayor profundidad el significado de estas asociaciones; enfocando principalmente la participación que tienen los productos del SPH tanto en la etiología como en la patogénesis. Estas enfermedades son: la espondilitis anquilosante, la miastenia gravis y la enfermedad de Graves.

En la espondilitis anquilosante como ya se dijo hay una asociación con el antígeno HLA-B27; entre los pacientes que tienen esta enfermedad, 90 % de ellos poseen el antígeno HLA-B27; sin embargo, sólo el 20 % de los individuos que nacen con este antígeno desarrollan la enfermedad. Hay evidencia de que algunos factores ambientales como ciertos agentes infecciosos, pueden ser importantes en la fisiopatología de esta enfermedad (40), por ejemplo, ciertas cepas de *Klebsiella* reaccionan en forma cruzada con el antígeno B27 produciendo una reacción autoinmune mediada por anticuerpos específicos (80).

En la miastenia gravis y la enfermedad de Graves la asociación es con el HLA-B8 y con el HLA-DR3: En la miastenia gravis, la alteración principal parece estar en las moléculas clase II del SPH, esto se sabe debido a que en el modelo murino experimental, se han podido identificar cambios en la cadena polipeptídica β de la región I-A (equivalente del DQ humano) en dicha cadena, existen tres sustituciones de aminoácidos en un espacio de tan solo cinco residuos, produciéndose una alteración en la molécula de los ratones mutantes, siendo esto relevante en la producción de anticuerpos dirigidos contra el receptor de acetilcolina (65). En la enfermedad de Graves (22), existe

evidencia de que dicha entidad surge como resultado de una infección viral, la cual precipita la producción anormal de moléculas clase II, en la superficie de células que normalmente no expresan tales moléculas. En esta enfermedad un producto de los genes clase II, se expresa en la superficie de la membrana de las células de la tiroides y se sitúa muy cerca al receptor de la hormona estimulante de la tiroides (TSHR). Esto a su vez activa a las células T cooperadoras, generándose así la producción de autoanticuerpos específicos que son los responsables de la patogénesis de la enfermedad; el papel de la infección viral, es de particular interés ya que éste agente por sí solo, no parece ser el factor crucial en la determinación del tipo de respuesta antigénica, sino que el tejido infectado por el virus puede ser el determinante principal del tipo de respuesta inmunitaria. Por ejemplo, si la infección viral ocurre en las células de los islotes del páncreas, el resultado es el desarrollo de la diabetes mellitus.

Se han propuesto varias hipótesis para explicar el papel de los alelos del SPH en el establecimiento de la susceptibilidad a enfermedades (63).

Entre éstas hipótesis se encuentran:

- 1.- La hipótesis de similitud molecular, la cual explica la susceptibilidad mediante reacción cruzada entre organismos infecciosos y un determinado antígeno del sistema HLA.
- 2.- La hipótesis del receptor, establece que ciertos antígenos HLA pueden actuar como receptores específicos para agentes infecciosos y que este evento está directamente relacionado con el desarrollo de la enfermedad.
- 3.- La hipótesis del antígeno HLA modificado, sugiere que los antígenos HLA están modificados químicamente por antígenos extraños y entonces el sistema inmunitario los reconoce como extraños, respondiendo por lo tanto con la producción del autoanticuerpo correspondiente, generándose así el estado de enfermedad.

4.- La hipótesis de genes de respuesta inmune intenta explicar que la asociación ocurre como resultado de respuesta versus no respuesta a un determinante crítico que es propio del agente patógeno.

Desde luego, ninguna hipótesis en forma aislada explica todas las relaciones que se han registrado y bien pudiera ser que cada uno de estos mecanismos, esté involucrado ya sea en uno o varios de los procesos de enfermedad asociados con el SPH.

III. ANTECEDENTES

ETIOPATOGENIA DE LA ESCLERODERMA

Se desconoce la causa de la escleroderma, aunque en años recientes se ha avanzado notablemente en el conocimiento de su patogenia. Las cuatro hipótesis más estudiadas apoyan el que se deba a una alteración primaria del fibroblasto, a la disminución en la producción de colagenasa, a una alteración vascular primaria o bien ha una alteración inmunológica primaria originada al parecer en el monocito. De las numerosas alteraciones de la inmuno-regulación encontradas en pacientes con escleroderma, destacan un número disminuido de las células de sangre periférica que tienen receptor para la porción Fc de la IgM (células u); a pesar de ello, se encuentra aumentada la función de ayuda, efectuada en gran parte por esta subpoblación celular (1,56). A diferencia de otras enfermedades del tejido conectivo, las funciones supresoras se encuentran normales en estos pacientes. Un hallazgo muy peculiar es la respuesta proliferativa temprana de los linfocitos T, de los pacientes con escleroderma, al estimularse en cultivo con sus linfocitos no T autólogos (1). Los linfocitos T de pacientes con escleroderma, al ser estimulados, también producen y responden normalmente a la IL-2 (2). sin embargo, los monocitos de algunos pacientes, principalmente con aquellos con enfermedad temprana,

producen, en forma espontánea, interleucina I (IL-1) (3). La señal amplificadora de esta monocina sobre los linfocitos T de pacientes con escleroderma es también anormal. Ambas anomalías sugieren una preactivación in vivo de los monocitos en pacientes con esta enfermedad, y alcanzan mayor importancia al considerar que la IL-1 induce proliferación de fibroblastos y producción de colágena.

Finalmente, en esta enfermedad parecen estar afectadas diferentes interacciones entre las células mononucleares y el fibroblasto. La mayor parte de esta comunicación está mediada por factores solubles; así, se han aislado diferentes factores producidos por monocitos, células mononucleares o linfocitos T, que inhiben o estimulan al fibroblasto a producir colágena (2,45).

CLASIFICACION DE LA ESCLERODERMA.

La escleroderma es una alteración generalizada del tejido conectivo caracterizada por fibrosis de la piel, insuficiencia vascular y cambios degenerativos en otros órganos. El diagnóstico de escleroderma y la división en subgrupos clínicos ha sido un problema por mucho tiempo. Existen muchas controversias en cuanto a lo extenso de la involucración de la piel y de otros órganos para hacer el diagnóstico. A continuación se presenta la clasificación que al parecer reúne a todos los subgrupos descritos.

I. Esclerosis sistémica progresiva.

A. Escleroderma difusa.

B. Síndrome de CREST.

C. Síndromes sobrelapados.

II. Fascitis eosinofílica.

III. Distrofia facial congénita,

IV. Forma localizada de escleroderma.

- A. Morfea.
 - 1. Semejante a placas.
 - 2. Generalizada.
 - 3. Formas poco típicas.
 - 4. Morfea atrófica primaria superficial.
- B. Escleroderma lineal con o sin hemiatrofia facial.
- C. Escleroderma en golpe de sable con o sin hemiatrofia facial.
- V. Condiciones semejantes a escleroderma inducidos químicamente.
 - A. Enfermedad por cloruro de vinilo.
 - B. Fibrosis inducida por pentazocina.
 - C. Fibrosis inducida por bleomicina.
 - D. Fibrosis inducida posiblemente por tricloroetileno.
 - E. Enfermedad semejante a escleroderma inducida por 5-hidroxitriptofano y carbidopa.
- VI. Esclerosis digital y contracturas articulares asociadas con diabetes mellitus juvenil.
- VII. Enfermedades con cambios de piel que semejan escleroderma (pseudoescleroderma).
 - A. Edematosas.
 - 1. Escleroderma relacionada a diabetes mellitus.
 - 2. Escleromixedema (mucinosi papular).
 - B. Indurativa y/o atrófica.
 - 1. Acromegalia.
 - 2. Amiloidosis primaria y asociada a mieloma.
 - 3. Fenilcetonuria.
 - 4. Síndrome calcinoide.
 - 5. Lipoatrofia localizada.
 - 6. Poiquiloderma congénita.
 - 7. Síndrome de Werner's.

8. Progeria.

9. Acrodermatitis crónica atrófica.

GENETICA DE LA ESCLERODERMA

La escleroderma es una enfermedad de etiología desconocida que se ha incluido en el grupo de las enfermedades del tejido conectivo. Desde el punto de vista clínico las manifestaciones que se presentan son sumamente complejas destacando entre ellas el engrosamiento y endurecimiento de la piel, cambios proliferativos en pequeñas arterias y arteriolas, lesiones microvasculares obliterativas, atrofia residual y fibrosis de órganos internos como corazón, pulmón, riñón y tracto gastrointestinal (58).

Al igual que otras enfermedades del tejido conectivo, la escleroderma se caracteriza por alteraciones a nivel del sistema inmune, de estas las más estudiadas por varios grupos de investigación son la presencia de autoanticuerpos tales como los anti-centromero y factor reumatoide (84), complejos inmunes circulantes (84), hipergamaglobulinemia (30), infiltrado linfocítico en tejidos afectados (50), alteración en el número de linfocitos T circulantes y aumento en la actividad de las células T cooperadoras (1).

Por otro lado, debido a que la escleroderma tiene al parecer un fondo autoinmune, se ha pensado en la participación de factores genéticos, los cuales, podrían estar interactuando con otro tipo de factores, que finalmente llegan a producir la alteración. En este campo existe una gran cantidad de estudios que apoyan esta noción y en los cuales se han encontrado básicamente seis hechos que incluyen de una u otra forma esta participación genética:

- 1.- Reportes de agregación familiar (64).
- 2.- Mayor frecuencia en mujeres (64).

- 3.- Prevalencia incrementada de anticuerpos antinucleares en familiares de individuos afectados (64).
- 4.- Alto grado de inestabilidad cromosómica incluyendo una tendencia a la ruptura de cromosomas y un aumento en el intercambio de cromátides hermanas (76).
- 5.- Susceptibilidad genética a una enfermedad fibrótica similar a escleroderma inducida por cloruro de vinilo (18).
- 6.- Asociación de la enfermedad con alelos del Sistema Principal de Histocompatibilidad (SPH).

Desde 1968 hasta la fecha existen una serie de trabajos en los que se reportan frecuencias de anticuerpos antinucleares en familiares de pacientes con escleroderma que fructúan entre un 12 y 58 % dependiendo del sustrato que se utiliza en la determinación (tabla 1).

Existen 2 trabajos en 1975 y 1988 (73,76) en los que se reporta un incremento en la ruptura de cromosomas en pacientes con escleroderma, otro en 1976 (38) reporta este aumento en familiares de pacientes y finalmente en 1981 (71) se encuentra un aumento en el intercambio de cromátides hermanas en pacientes con escleroderma (tabla 2).

La participación de antígenos de SPH en la susceptibilidad para producir fibrosis al contacto con el cloruro de vinilo se estudió en 165 sujetos expuestos a este producto químico (110 sanos y 55 afectados). De los 55 sujetos susceptibles 16 presentaron un mismo antígeno del SPH mientras que de los sujetos sanos sólo 1 tuvo este mismo antígeno (18).

Los estudios de asociación de la enfermedad con antígenos del SPH se tratarán con más detalle a continuación.

Tabla 1. Anticuerpos antinucleares en familiares de pacientes con Escleroderma.

Autor	Hallazgo
Fennell 1962.	58 % (29 de 50)
Rothfield 1968.	12 % (10 de 83)
Tuffanelli 1969.	18 % (7 de 40)
Soppi 1982.	50 % (3 de 6)
Takehara 1985.	17 % (6 de 35)
Maddison 1986.	27 % (58 de 217)
McGregor 1988.	57 % (8 de 14)

Tabla 2. Ruptura de cromosomas e intercambio de cromatides hermanas en escleroderma.

Autor	Hallazgos
Pan 1975	RC aumentado en 63 pac.
Emerit 1976	RC aumentado en 21 fam.
Sherer 1981	FICH aumentado en 3 pac.
Palmer 1986	FICH normal en 63 pac. y 31 familiares.
Rittner 1988	RC aumentada en 27 pac.

RC = Ruptura de Cromosomas.
 FICH = Intercambio de cromatides hermanas.

HLA Y ESCLERODERMA

Los resultados de los estudios inmunogenéticos efectuados en diferentes países, son muy heterogéneos, habiéndose reportado asociaciones con antígenos de clase I, clase II y clase III (tabla 3).

También cabe señalar que dicha heterogeneidad está muy influenciada por el componente étnico de los pacientes, de tal suerte que los antígenos que están asociados con la enfermedad en un grupo, no lo están necesariamente en otro, existiendo a su vez trabajos que no comprueban ninguna asociación (tabla 4).

De los antígenos presentados en la tabla 3 los que parecen tener mayor relevancia son los pertenecientes a los genes clase II y clase III.

Tabla 3. Antígenos del SPH asociados a Escleroderma.

<u>CLASE I</u>	<u>CLASE II</u>	<u>CLASE III</u>
Locus A:	Locus DR:	Locus C4:
Aw24	DR3	C4AQ0
A9	DR1	C4BQ0
	DR5	
	DRw11	
Locus B:	DRw8	
B27		
B8		

(Tomado de 10,21,30,39,42,47,50,56,57,58,64,71,93)

Tabla 4. Reportes que no comprueban asociación del HLA con la escleroderma.

Autor	Sujetos de Estudio
Crouzet J. 1975. (Francia).	49 Pacientes 152 Controles
Birnbaum N.S. 1977. (USA).	106 Pacientes 208 Controles
Majsky A. 1979. (Checoslovaquia).	58 Pacientes 301 Controles
Giordano M. 1979. (Italia).	40 Pacientes 30 Controles
Niks M. 1982. (Checoslovaquia).	45 Pacientes 115 Controles

Clase II (tabla 5).

En 1982 Linch C.J.(60) en Estados Unidos reportó un estudio que incluía 145 pacientes con escleroderma de los cuales 79 tenían la forma difusa de la enfermedad y los comparó con un grupo de 95 sujetos control. El encontró asociación significativa con el HLA-DR1 ($p < 0.005$) en los pacientes en general y, al dividirlos por subtipo clínico, en los de la forma difusa ($p = 0.005$).

En 1981 Germain B.F. (USA)(41) y Kallenberg (Inglaterra) (52) independientemente encontraron asociaciones con el HLA-DR3. Germain estudió 14 pacientes con síndrome de CREST y los comparó con 45 sujetos control ($p < 0.005$) y Kallenberg revisó 27 pacientes comparados con 123 controles ($p < 0.0008$).

El antígeno HLA-DR5 se reportó asociado a la enfermedad en 1981 por Gladman (Canadá) (44) y en 1987 por Luderschmidt (Alemania) (59). Gladman estudió a 34 pacientes y los comparó con 180 controles ($p < 0.0001$), Luderschmidt por su parte estudió 136 pacientes comparados con 4000 controles ($p < 0.003$).

Recientemente Dunckley (1989) (35) en Australia utilizando análisis de RFLPs (Fragmentos de Restricción Polimorficos) reportó la participación del DRw11 que es un subtipo de DR5, en 41 pacientes con escleroderma de los cuales 21 tenían CREST y 20 la forma difusa.

Barnett A.J. (12) también en Australia reporta en 1989 la participación del DRw8 en un grupo de 46 pacientes, 27 con la forma limitada y 19 con la difusa.

Tabla 5. Participación de antígenos clase II.

HLA	Sujetos	Estadística	Autor
DR1	145 Pacientes 79 Difusa 95 Controles	$p < 0.005$ $pC < 0.05$ $p < 0.005$ $pC < 0.05$	Lynch C.J. 1982 (USA)
DR3	14 CREST 45 Controles	$p < 0.005$ $pC < 0.03$	Germain B.T 1981 (USA)
DR3	27 Pacientes 123 Controles	$p < 0.001$ $pC < 0.03$	Kallenberg C.G 1981 (INGLA)
DR5	34 Pacientes 180 Controles	$p < 0.0001$ $pC < 0.003$	Gladman D.D. 1981 (CAN)
DR5	136 Pacientes 4000 Controles	$p < 0.003$ $pC = 0.03$	Luderschmidt 1987 (ALEM)
DRw11	41 Pacientes 21 CREST 20 Difusa 62 Controles	$p < 0.0001$ $pC < 0.001$ $p < 0.0005$ $pC < 0.01$ $p < 0.0005$ $pC < 0.01$	Dunckley H. 1989 (AUSTRALIA)
DRw8	46 Pacientes 27 Limitada 19 Difusa 201 Controles	$p < 0.0001$ $p < 0.0001$ $p < 0.005$	Barnett A.J. 1989 (AUSTRALIA)

Clase III (tabla 6):

La participación de estas moléculas ha sido poco estudiada en esta enfermedad existiendo en la literatura unos cuantos trabajos como los realizados por Mollenhauer (66) en Alemania en 1984 en el que estudiaron a 17 pacientes y 144 controles; él encontró un aumento significativo de los homocigotos para los alelos nulos en C4B (C4BQ0Q0)($p < 0.001$).

Black en Inglaterra en 1985 reportó la asociación con alelos nulos de C4A en 22 pacientes ($p = 0.002$) y finalmente Briggs (23) también en Inglaterra en 1986 comprobó esta asociación en 25 pacientes con escleroderma ($p < 0.0001$).

Tabla 6. Participación de moléculas clase III en pacientes con escleroderma.

Antígeno	Sujetos	Estadística	Autor
C4BQ0Q0	17 Pacientes 144 Controles	$p < 0.001$	Mollenhauer, E. 1984 (ALEMAN).
C4AQ0	22 Pacientes 100 Controles	$p = 0.002$	Black, C.M. 1985 (INGLA).
C4AQ0	25 Pacientes 42 Controles	$p < 0.0001$	Briggs, D.C. 1986 (INGLA):

Una vez realizados los estudios de asociación de los antígenos del HLA con la enfermedad, algunos investigadores se han dado a la búsqueda de asociaciones más que con la enfermedad, con características propias de ella como son la ruptura de cromosomas, la presencia de autoanticuerpos y la respuesta inmune celular ó humoral alterada.

RUPTURA DE CROMOSOMAS Y HLA.

A este respecto sólo hay un trabajo reportado en 1988 (76) , en el que se estudiaron 28 pacientes con escleroderma y a sus familiares. De los pacientes, 27 tuvieron un aumento en la ruptura de cromosomas y de las familias en 9 de ellas la ruptura segregó como un marcador dominante, en 6 de éstas la ruptura estuvo en desequilibrio de ligamiento con el haplotipo A1,Cw7,B8,DR3,SC01.

AUTOANTICUERPOS Y HLA.

La frecuencia de los anticuerpos antinucleares en el suero de los pacientes con escleroderma varía entre el 40 y el 98 % dependiendo del sustrato usado para su determinación. En años recientes se han identificado dos anticuerpos con relativa especificidad para escleroderma: anti-Sc170 y anticentrómero. El anti-Sc170 es el más frecuente en pacientes con la forma difusa de la enfermedad, mientras que los anticentrómero son frecuentemente asociados con el síndrome de CREST (93). Recientes estudios han mostrado que el anti-Sc170 es un anticuerpo anti-topoisomerasa I (70).

Una vez definidos estos anticuerpos se ha tratado de asociar su presencia con algunos antígenos del SPH. Por ejemplo, destaca la asociación de los anticuerpos anticentrómero con el HLA-DR1 y los anti-Scl70 con el HLA-DR5 (58,84). En el cuadro 7 se presenta el trabajo realizado por Steen y colaboradores en una población caucásica en el que se enfatizan tales asociaciones.

Tabla 7. Relación de autoanticuerpos con el HLA.

		DR1(+)	DR5(+)
AAC(+)	n=43	30 *	30
Scl-70	n=52	8	58 *
AAC(-)			
Scl-70(-)	n=111	19	20
Cont.	n=95	12	31

* p<0.01

AAC= Anti-Centrómero

Steen V.D.
1988 (USA).

IV. HIPOTESIS.

Que existe un haplotipo del sistema principal de histocompatibilidad más frecuente en sujetos afectados por escleroderma que en los sujetos normales.

V. OBJETIVOS.

- 1.- La tipificación de las moléculas clase I (HLA-A, -B y -C) y clase II (HLA-DR y -DQ) del sistema principal de histocompatibilidad en 50 sujetos con escleroderma.**
- 2.- La tipificación las moléculas clase III (C2, C4 y factor B) en estos mismos sujetos.**
- 3.- Tipificar todos estos marcadores en los familiares consanguíneos en primer grado del mismo grupo de enfermos.**

VI. MATERIALES Y METODOS

MUESTRA.

El estudio incluye 41 familias mexicanas (personas emparentada en primer grado: padres, hermanos y/o hijos, residentes en la República Mexicana con al menos tres generaciones nacidas en México según información proporcionada por los familiares) con al menos 1 caso índice (CI) (Individuo mayor de 18 años, seguido en el departamento de inmunología y reumatología de el Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán"), que llena los criterios de la American Rheumatism Association para escleroderma. De las 41 familias, se tipificaron a 41 pacientes y 113 familiares sanos teniendo un total de 82 haplotipos enfermos (heredados por el paciente) y 51 haplotipos sanos (no heredados por el paciente y si por sus familiares no enfermos). De los 41 pacientes, 22 presentaron escleroderma difusa (44 haplotipos), 11 el síndrome de CREST (22 haplotipos), 5 escleroderma localizada (10 haplotipos) y solo 3 el síndrome de Reynolds (6 haplotipos). El diseño experimental de este estudio es transversal, observacional, y analítico/descriptivo. Como grupo testigo de comparación se utilizaron los datos de 50 familias control de sujetos no relacionados de los cuales se obtuvieron 200 haplotipos.

TIPIFICACION DE MOLECULAS CLASE I Y II.

A.- MATERIALES Y EQUIPO.

Jeringas estériles.

Agujas estériles.

Pipetas graduadas (1,2,5,10,50 ml).

Pipetas Pasteur.

Jeringa Hamilton de disparo constante (1 ul).

Jeringa multiple Hamilton de disparo constante (5 ul).

Jeringa multiple Hamilton de disparo constante (1 ul).

Tubos Falcon de 50 ml.

Tubos de vidrio, 13X100 ml.

Tubos Fisher.

Cajas Petri.

Camara de Neubauer.

Balanza analitica.

Microplacas para microinfototoxicidad, Nunc.

Vortex.

Centrifuga refrigerada CU-5000 Damon/JEC Devison.

Centrifuga Fisher.

Microscopio Invertido de Contraste de fases (Zeizz).

Microscopio óptico.

Negatoscopio.

B. REACTIVOS.

1.- Heparina.

Se utiliza como anticoagulante, (1000 UI/ml) un volumen de 100 UI por cada 10 ml de sangre.

2.- Medio RPMI 1640.

Medir 950 ml de agua desionizada en un matraz de Erlenmeyer, añadir el contenido de un sobre del medio al agua, agitar, añadir 2g de bicarbonato de sodio. agregar los 50 ml restantes de agua

desionizada. Ajustar el pH 0.2 a 0.3 unidades por arriba del pH deseado (7.35). Usar NaOH o KCl 1N para ajustar. Esterilizar por milliporo de 0.22 micras. Guardar a 4 C°.

3.- Ficoll-Hypaque.

Ficoll 9% en agua destilada 12 partes.

Hypaque 34% en agua destilada 5 partes (Winthrop).

La densidad de la mezcla deberá ser de 1.076-1.078.

4.- Solución amortiguadora salina de Fosfatos (PBS).

NaCl 15.3 g.

Na₂HPO₄ 7.6 g.

KH₂PO₄ 0.125 g.

Agua destilada hasta 2 lts.

Llevar hasta pH 7.4 con HCl 6N.

5.- Complemento.

Obtenido comercialmente de Pel-Freez.(N. Deerbrook Tr. Brown Deer. WI)

6.- Fibra de Nylon-Lana.

Se utiliza Nylon de Travenol laboratorios, si no se cuenta con este material se emplea fibra de nylon "celanese" y se trata:

1. Se lava la fibra con HCl 1N 3 veces.

2. Se elimina el HCl con agua destilada.

3. Se lava 3 veces con NaOH 1N.

4. Se lava el exceso de alcali con agua destilada.

5. Se confirma el pH hasta que el último lavado sea igual al del agua.

6. Se pone a secar extendida en la estufa a 37 °C.

Preparación de la columna.

1. En una caja de petri se peinan 0.3 gr de nylon-lana con pinzas o pipeta pasteur.
2. El nylon-lana se empaca cuidadosamente en una jeringa de 10 ml.

C. MATERIAL BIOLÓGICO.

1. Veinte ml de sangre venosa heparinizada.
2. Eritrocitos de carnero al 4% en PBS.
3. Antiseros de diferentes especificidades anti-HLA obtenidos de diferentes fuentes (C. Six. N. Granville Road, Mequon, WI y Pel-Freez N. Deerbrook Deer. WI).

D. TÉCNICAS

- a). Separación de linfocitos por gradiente de Ficoll-Hypaque.
 1. Se toman 20 ml de sangre venosa heparinizada.
 2. Se diluye la sangre con un volumen igual de PBS pH 7.4
 3. Se colocan 15 ml de ficoll hypaque en un tubo de 50 ml de marca falcon y se le agrega la dilución de la sangre y el PBS cuidadosamente por las paredes del tubo.
 4. Se centrifuga a 2500 rpm 20 minutos a temperatura ambiente.
 5. Se aspira con pipeta pasteur la interfase formada por la capa de mononucleares y se pasa a otro tubo.
 6. El paquete de mononucleares se diluye en PBS y se centrifuga a 1000 rpm durante 10 minutos para eliminar las plaquetas.

7. Se descarta el sobrenadante y el paquete se resuspende en PBS y se centrifuga a 1000 rpm 10 minutos.
8. Se repite el paso 7.
9. Se descarta el sobrenadante y el paquete se resuspende para ajustar a 5×10^6 cels/ml.
10. Estos linfocitos se pueden utilizar para la tipificación de moléculas clase I.

b). Purificación de linfocitos T y B.

Para la purificación de los linfocitos T y B se utilizarán tres técnicas diferentes; las tres técnicas con inmunofluorescencia para probar pureza de linfocitos B.

Técnica de Nylon-Lana.

1. Los linfocitos previamente purificados y resuspendidos en 2 ml de RPMI+10% suero bovino fetal (SBF) se colocan en la columna de nylon, a la que previamente se ha lavado con 5 ml de RPMI y se ha activado con 10 ml de RPMI +10% SBF durante 30 min, hasta que todo el líquido penetre en el nylon. Inmediatamente después se coloca la columna en posición horizontal.
2. Se incuba horizontalmente 45 minutos a 37 °C.
3. Se coloca la columna sobre un tubo marcado para los linfocitos T y se deja escurrir el contenido.
4. Se le agregan por la jeringa 30 ml de RPMI + 10% SBF.
5. Se coloca la columna sobre un tubo marcado para los linfocitos B y se le agregan 30 ml de RPMI+SBF 10% frío.
6. Se centrifugan las células T y B a 1500 rpm durante 10 min y se ajustan a 5×10^6 cels/ml..

NOTA: Al comenzar la separación se debe incubar el RPMI a 4 °C y a 37 °C para que al momento de usarlo tenga la temperatura deseada.

Separación de células B por Limpho-Kwik.

Técnica Comercial.

Para la separación de 0.5 a 2×10^6 linfocitos B.

1. Obtener de 5 a 20 millones de linfocitos totales a partir de ficoll-hypaque.
2. Pasar el botón de linfocitos a un tubo de 1 ml marca fisher y centrifugarlo a 1000 g por un minuto.
3. Añadir 0.8 ml de reactivo 1 (un anticuerpo monoclonal) y mezclar bien.
4. Incubar a 37°C por una hora en baño maria o incubador y mezclarlo ocasionalmente.
5. Terminada la incubación adicionar 0.2 de RPMI+SBF10% y centrifugar 2 minutos a 2000 g.
6. Descartar el sobrenadante y agregar 0.5 ml de reactivo 2 (fuente de complemento) mezclar bien.
7. Centrifugar a 2000 g dos minutos.
8. Retirar el sobrenadante y lavar los linfocitos dos veces con RPMI+10% SBF, centrifugarlo a 1000 g un minuto.
9. Resuspender con 1 ml de medio el botón celular y observar la viabilidad. En caso de presentar celulas muertas remover con DNAsa o gradiente de ficoll-hypaque.

RECOMENDACIONES: Estos reactivos son útiles para purificar los linfocitos B de pacientes: diabéticos, de Hodgkin, cáncer no leucémico y donadores cadavéricos. Su uso no se recomienda en células congeladas y muestras de mas de dos días.

Separación de células T y B mediante la formación de rosetas.

1. Se utilizan los glóbulos rojos de carnero (GRC) de máximo 2 semanas de almacenamiento en solución de Alserver's, lavados tres veces con PBS y ajustados al 4% con solución salina.
2. Los linfocitos ya purificados por ficoll-hypaque y resuspendidos en RPMI+10% SBF a una concentración de 5×10^6 cels/ml son colocados en cajas de petri e incubados a 37°C durante 1 hora (para eliminar macrófagos).
3. Posterior a la incubación, con pipeta pasteur se recolecta el medio con células y se enjuaga la caja con RPMI y se recolecta en el mismo tubo.
4. Se centrifugan las células y se concentran a 10×10^6 cels/ml en RPMI+10% SBF.

5. Se le agrega la mitad de su volumen en SBF.
6. Se agrega GRC en igual proporción que las del volumen inicial de la concentración de células.
7. Se centrifuga en frío a 1200 rpm durante 10 minutos.
8. Se incuba a 4 °C durante 12 a 18 horas.
9. Se mezcla suavemente la suspensión y se deposita un gradiente de ficoll-hypaque (todo a 4 °C).
10. Se centrifuga a 2000 rpm 20 minutos.
11. Se saca el anillo de células B.
12. Se lava con PBS a 1500 rpm durante 15 minutos.
13. El botón se resuspende en PBS y se centrifuga 2 veces a 1000 rpm 10 minutos.

ENSAYO DE MICROLINFOTOXICIDAD PARA TIPIFICACION DE ANTIGENOS.

CLASE I Y II (37,90).

1. En cada uno de los pozos de las cajas con antisueros se coloca 1 ul de la suspensión de células T o B.
2. Las cajas con los antisueros para clase I se incuban durante 30 minutos y las microplacas para los clase II 60 minutos.
3. Se agregan 5 ul del complemento de conejo correspondiente para cada molécula (I y II) a cada pozo.
4. Las microplacas para las moléculas clase I se incuban durante 1 hora y las clase II se incuban 2 horas.
5. Se agregan 2 ul de eosina a cada pozo, y se deja reposar 3 a 5 minutos.
6. Se agregan 5 ul de formalina (formaldehído al 40% + 0.3 g Na_2HPO_4 + 0.1 g NaH_2PO_4).
7. Se lee en microscopio invertido, se cuenta el número de células vivas y muertas y los resultados se informan de acuerdo a la siguiente relación:

% de mortalidad	Número
0 al 10	1
11 – 20	2
21 – 40	4
41 – 80	6
81 – 100	8

TIPIFICACION DE LAS MOLECULAS CLASE III.

FACTOR B (FB) DE LA VIA ALTERNA DEL COMPLEMENTO.

El polimorfismo del factor B se determina mediante la técnica de electroforesis de alto voltaje en gel de agarosa, e inmunofijación de las bandas de proteínas mediante anticuerpo específico (5,6).

A. Equipo.

1. Cámara Deluxe para electroforesis Gelman Science.
2. Fuente de Poder Deluxe Gelman Science.
3. Bomba de agua circulante Thomas Scientific.
4. Centrifuga CU-5000 Damon/ JEC Devisión.
5. Balanza analítica Sartorius.
6. Agitador magnético con platina de calentamiento.

B. Material.

1. Rectángulo de película de plástico de 10 x 20 cms (Gel Bond Film Marine Callods. Maine USA).
2. Placas de vidrio de 10 x 20 cms.
3. Marcos de plástico en forma de "U" de 1 mm de espesor.
4. Papel filtro tipo Whatman No.1.
5. Aplicador de muestras.
6. Micropipetas de 15 y 25 ul.
7. Sujetadores.

C. Reactivos.

1. Amortiguador de barbital y lactato de calcio 0.05 M pH 8.6 .
2. Agarosa Sea-Kem Maine USA al 1% en amortiguador de barbital
3. Solución salina al 0.85%.
4. Glicerol.
5. Solución de azul de Coomassie al 2.5% (en una solución 45% metanol, 10% ácido acético en agua).
6. Solución decolorante (metanol al 50% en agua destilada más la quinta parte del volumen total de ácido acético).

D. Material Biológico.

1. Plasma obtenido con EDTA de 5 ml de sangre.
2. Alicuota de hemoglobina humana normal.
3. Anticuerpo anti-factor B. Atlantic Antibodies. Scarborough, Mo USA).

E. Técnica.

1. Preparación del gel.

Cubrir la placa de vidrio mediante una brocha con una capa de glicerol, inmediatamente colocar la película de plástico y presionar para sacar las burbujas de aire. Posteriormente colocar el marco de plástico en forma de "U" el cual, se fija a la placa mediante los sujetadores, una vez lista la cámara se vacía la solución de agarosa caliente y se deja solidificar. Ya que se solidifica el gel, se quitan los sujetadores y el marco de plástico, se seca con papel filtro la zona donde se aplicaran las muestras.

2. Aplicación de las muestras.

Con papel filtro Whatman No. 1 se seca aproximadamente 3 cm del final del gel (a través de todo el gel) donde se aplican las muestras (Cátodo). Repetir el proceso dos veces. Sobre el área seca se coloca un aplicador plástico que tiene perforaciones rectangulares para aplicar las muestras (MASK). En la primera perforación se colocan aproximadamente 10 ul de hemoglobina A que sirve como indicador visual y en las demás se coloca el mismo volumen de cada muestra (12 muestras). Se espera hasta que las muestras se hayan absorbido en el gel (aproximadamente 15 min). Se quita el exceso de muestra que no penetró con papel Whatman No. 1 y se retira el aplicador de plástico.

3. Corrimiento de las muestras.

Las placas se colocan sobre bases enfriadas por agua circulante entre 6 y 10 °C para evitar el sobrecalentamiento de la agarosa. El contacto entre el gel y el amortiguador electrodo se realiza mediante una mecha constituida por 4 hojas de papel filtro Whatman No. 1 (del mismo ancho que la placa del gel) perfectamente humedecida en el amortiguador. Una de las puntas de la mecha se coloca atrás de las muestras y la otra a un cm del final del gel, entre las dos mechas debe haber una distancia de 6.5 cm.

La superficie del gel se cubre con un vidrio para prevenir desecamiento y la electroforesis se lleva a cabo a 350 V (75 mA) hasta que la hemoglobina haya migrado hasta la segunda mecha (alrededor de 3 horas).

4. Inmunoprecipitación.

Las bandas del factor B migran en una zona de 3 a 6.5 cm del origen. En esta zona debe aplicarse el antisuero específico anti- γ B humano.

Se incuba el gel durante 1-2 hrs a temperatura ambiente en una cámara húmeda horizontal.

Se enjuaga posteriormente el gel con agua destilada y se cubre completamente la superficie con papel Whatman, el cual ha sido humedecido con agua destilada. Esto se cubre ahora con aproximadamente 12 hojas de papel secante tipo toalla. Se coloca encima una placa de vidrio y un peso de aproximadamente 4 kilogramos.

Se remueve después de 10 min y se quita el peso y el papel. Posteriormente el gel se enjuaga durante toda la noche en un litro de solución salina para remover restos de proteínas inespecíficas.

Enseguida, el gel se lava en agua destilada durante 20min , se seca al aire libre ó aplicando calor.

Se tiñe la placa con solución de azul de coomassie durante 10 min.

Se destiñe la placa con la solución decolorante hasta obtener el mejor contraste.

Se deja secar el exceso de metanol a temperatura ambiente.

Se lee la placa. Las variantes electroforéticas obtenidas se muestran en la figura 5.

TIPIFICACION DEL FACTOR C4 DEL SISTEMA DEL COMPLEMENTO

El cuarto componente del complemento C4 es codificado por dos loci cercanamente unidos entre sí y localizados entre los loci HLA-B y HLA-D en el brazo corto del cromosoma 6 humano. La electroforesis seguida de inmunoprecipitación y tinción de muestras de plasma, previamente tratadas con neuraminidasa de *clostridium perfringes* para eliminar el ácido siálico, revela que ambos loci de C4 (C4A y C4B) son altamente polimórficos.

TECNICA.

1. Desialización.

Diez ul de la muestra se mezclan con 2 ul de neuraminidasa y se colocan en un sistema de diálisis continua durante 18 horas a 4 °C.

2. Preparación del gel.

Se cubre una placa de vidrio de 26 cm x 12.5 cm con una solución de agarosa al 0.5% en agua destilada, se deja secar.

Se forma un molde colocando encima de la placa anterior una segunda placa de plástico siliconizado de 1 mm de espesor, se mantienen juntas las placas mediante clips metálicos.

Se prepara una solución de agarosa al 0.75% en una mezcla de 60 ml de agua desionizada, 35 ml de buffer para C4 y 5 ml de EDTA 0.2 M.

Se vierte la solución de agarosa de corrimiento para C4 aún caliente dentro del molde y se deja solidificar, se sella perfectamente el molde con envoltura de plástico y se almacena en refrigeración hasta su uso.

3. Aplicación de la muestra.

Se reduce el exceso de agua del gel de corrimiento colocando 2 veces sobre el una tira de 5 cm de ancho de papel filtro Whatman No. 1.

Se coloca el aplicador plástico para muestras (MASK), de tal forma que las muestras queden a unos 2 cm del extremo final del gel.

Se colocan de 7 a 10 μ l de muestras dializadas en cada ranura del aplicador.

Se coloca una muestra de HbS al principio como marcador visual.

Una vez que las muestras se han adsorbido en el gel, se retira el aplicador.

4. Corrimiento electroforético.

Se coloca la placa con el gel en el equipo de electroforesis, con las muestras en el cátodo.

Se utilizan 5 hojas de papel Whatman No. 1 (del tamaño de la placa del gel) y se colocan en el amortiguador de corrimiento; lo mismo se hace en el ánodo, quedando entre las dos mechas una distancia de 10.5 cm.

Se cubre la placa para evitar la desecación y se ajusta la fuente de poder a una corriente constante de 65 mA (300–350 volts) y se deja correr hasta que el marcador de la HbS ha alcanzado el extremo opuesto (4–5 horas).

5. Inmunoprecipitación.

Se agregan 0.5 ml de anticuerpo anti-C4 humano en una area de aproximadamente 5 cm en el centro del gel.

Se incuba el gel durante 1–2 horas en una cámara húmeda.

Se enjuaga el gel cuidadosamente bajo un chorro de agua.

Se cubre el gel con una hoja de papel Whatman No. 1 humedecido con agua destilada, seguido de 10 hojas de papel absorbente tipo toalla y una placa de vidrio o plástico. Se coloca encima un peso de 4 kilogramos y se deja así durante 10 min.

Se enjuaga el gel en solución salina durante toda la noche y posteriormente se lava con agua corriente durante 20 min.

Se seca el gel y se tiñe con una solución de azul de coomasie. Las bandas obtenidas se observan en la figura 7.

TIPIFICACION DEL FACTOR C2 DEL SISTEMA DEL COMPLEMENTO.

El polimorfismo del segundo componente del complemento puede ser detectado después de isoelectroenfoque de muestras de plasma o suero en un gel de acrilamida seguido por la aplicación de un recubrimiento hemolítico funcional. La lisis del complemento ocurre en el sitio que contiene eritrocitos de carnero sensibilizados y todos los componentes del complemento, excepto C2, esa será la posición de la proteína (57). Las bandas polimórficas de este componente del complemento son mostradas en la figura 6.

TECNICA.

I. Preparación de la solución de eritrocitos de carnero sensibilizados.

Se toman 20 ml de eritrocitos de carnero al 10%.

Se lavan 4 veces con solución de VBS-EDTA 0.01 M a 2000 rpm durante 10 min.

Se lavan 4 veces a 2000 rpm durante 10 min con solución de GVB (agarosa-VBS).

Se resuspende el paquete celular con GVB (1 parte de células a 10 partes con GBV).

En una celda de espectrofotómetro se adicionan 0.1 ml de la suspensión celular y 2.4 ml de agua destilada.

Se ajusta a cero con un blanco de agua destilada.

Se lee la concentración de hemoglobina a una longitud de onda de 541 nm.

Cuando la absorción es de 0.420, la concentración celular es de 1×10^6 celulas/ml. El rango de aceptación para la concentración es de 0.40-0.43 nm para llegar a la concentración requerida se utiliza la siguiente formula:

$$\frac{\text{Lectura obtenida} \times \text{volumen de la suspensión celular}}{0.420} = \text{Volumen al que se debe llevar}$$

Se incuba 15 min a temperatura ambiente. Los eritrocitos sensibilizados se gurdan a 4 °C.

2. Preparación del gel.

Se coloca sobre un vidrio de 20.5cm x 15 cm, un marco de plástico siliconizado de 1mm de espesor y 0.5 cm de ancho (el marco cubre 3 lados). Encima de este último se coloca una placa de plástico siliconizado de las mismas dimensiones del vidrio. Se mantienen las placas juntas con clips metálicos, de tal forma que se obtine una cámara de 1mm de espesor, con un extremo abierto.

Para hacer el gel se combina solución stock de acrilamida 26.5 ml, anfolina 1.5 ml, y solución de riboflavina 7 ml.

Se vacía la mezcla con la ayuda de una pipeta de boca ancha y se deja polimerizar el gel bajo una lámpara de luz fluorescente durante una hora.

Se enfoca el gel durante 18 horas, o hasta que la corriente haya caído a 2 mA/gel.

3. Ensayo hemolítico funcional.

Después del electroenfoque, se enjuaga el gel en una solución de yoduros durante 30 min a temperatura ambiente.

Se vacía la solución de yoduro y se enjuaga el gel en la solución de VBS-Ca, Mg.

Después de enjuagar la placa con el gel, se coloca un marco de 2mm de espesor y un vidrio de 20.5 cm x 15 cm y se fija con clips.

Se hace la siguiente mezcla y se vacía en la cámara anterior.

Solución VBS Ca Mg 7.5 ml, agarosa al 2% 7.5 ml, solución de eritrocitos sensibilizados 0.75 ml, suero deficiente en C2 0.2 ml.

Se incuba el gel durante 1 hora a 4 °C y después a 37 °C (durante 2 a 4 horas) hasta que las bandas de lisis aparezcan.

Se obtiene solamente la capa de eritrocitos y se lava en una solución que contiene 300 ml de PBS y 3 ml de glutaraldehído. Se enjuaga 30 min Se deja secar a temperatura ambiente. Los patrones obtenidos se muestran en la fig. 6.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

El diseño del estudio es transversal (es decir la tipificación del HLA clase I,II y III es única), prospectivo (la lectura o recopilación de los datos o variables se hizo prospectivamente), observacional (se observó la estructura genética en el sistema HLA, no se introduce ninguna maniobra experimental) y analítico/descriptivo (se busca asociación o relación de causalidad entre herencia y patología y describe los haplotipos que luego se analizan), comparativo por que contrastan en una misma familia afectados, portadores y sanos (en relación a haplotipo) y los pacientes con la población general.

Para el análisis estadístico se usaron las pruebas de χ^2 (31).

La comparación entre dos grupos de estudio en función de dos características independientes, se efectúa generalmente mediante tablas de contingencia de 2 x 2.

Para poder establecer la probabilidad de que ambos grupos difieran uno del otro en forma significativa, y que su variación no haya sido solo debida al azar, la tabla de 2 x 2 se evalúa mediante la prueba estadística X^2 .

$$X^2 = \frac{(ad - bc)^2 N}{(a+b)(c+d)(a+c)(b+d)}$$

Si el valor obtenido de la prueba de X^2 implica un valor de "p" menor a 0.05, la hipótesis nula que dió lugar a la comparación se rechaza. Un valor de $p < 0.05$ significa que en menos de 1 en 20 casos se cometen errores al rechazar la hipótesis nula.

El valor de "p" se obtiene al interpolar en tablas de distribución X^2 el valor numérico de X^2 en función de los grados de libertad de la prueba. Para todas las tablas de contingencia de 2 x 2 se considera un grado de libertad. Si las cifras esperadas en a, b, c ó d fueran menores a 5, la prueba de X^2 deja de tener validez y se debe utilizar en este caso la prueba exacta de Fisher que nos da directamente el valor de "p".

$$f = \frac{(a+b)! (c+d)! (a+c)! (b+d)!}{a! b! c! d! N!}$$

El valor de p fue corregido utilizando la fórmula de Yates que le da más fuerza a la comparación

$$[(ad-cb)-0.5]^2 N$$

a b c d N

Se calculó el riesgo relativo (RR) para cada antígeno estudiado.

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

VII. RESULTADOS

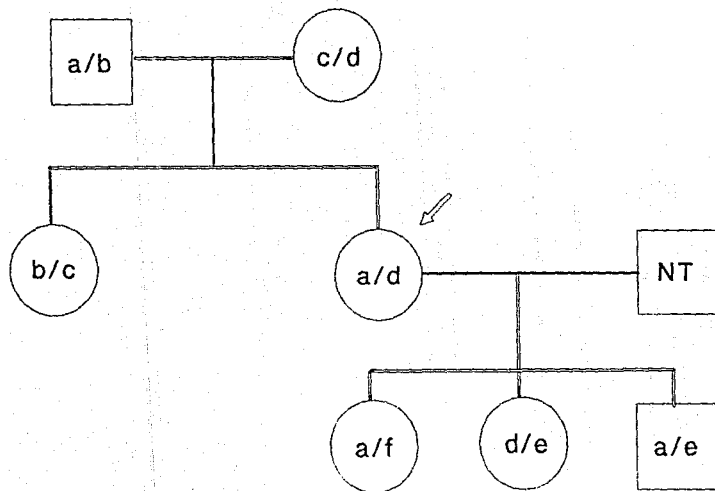
Se tipificaron 41 familias que incluyeron a 41 pacientes con escleroderma definida según los criterios de la ARA y 113 familiares en primer grado, de estos finalmente se obtuvieron 82 haplotipos enfermos (portados por los pacientes) y 51 haplotipos sanos (no presentes en los pacientes). En las figuras 8 y 9 se muestran 2 árboles genealógicos de familias tipificadas. Como grupo control se tipificaron a 50 familias de sujetos sanos de las cuales se obtuvieron 200 haplotipos. De los 41 pacientes 36 (87.8%) fueron mujeres y 5 (12.1%) fueron hombres.

Debido a lo anterior se contó con tres grupos de estudio: pacientes, familiares y controles, los cuales fueron comparados entre sí por la prueba de chi-cuadrada (χ^2).

Dada la heterogeneidad clínica de la enfermedad el primer análisis se realizó considerando a todos los pacientes como un solo grupo sin tomar en cuenta el subtipo clínico al que pertenecían. La frecuencia del HLA-DR5, estuvo aumentada de manera significativa en los pacientes comparada con los controles de la población normal mexicana según se muestra en la tabla 10. Además hubo un incremento significativo en cuanto a su frecuencia del complotipo FC31 y del alelo C4B*1 (tablas 10 y 11). De la misma forma la frecuencia de los alelos HLA-B16 y HLA-DR8 se encontró disminuida (tablas 9 y 10). De los otros alelos el HLA-A19 mostró una frecuencia disminuida pero no significativa al compararse con los controles (tabla 8). El resto de los alelos del HLA-A, -B, -C, -DR y complotipos mostraron una frecuencia igual a la de la población normal mexicana.

Figura 8

Escleroderma Difusa



96

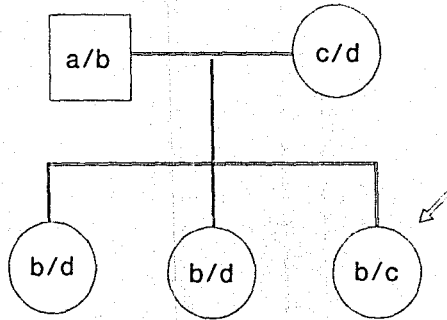
Haplotipos:

- a) A10,B15,DR3,DQw1,DRw52,SC01
- b) A2 ,B53,DR6,DQw1,DRw52,SC31
- c) A11,B40,DR4,DQw3,DRw53,SC31
- d) A19,B18,DR3,DQw1,DRw52,SC31
- e) A28,B35,DR8,DQw1,DRw53,FC31
- f) A11,B5 ,DR7,DQw3,DRw52,FC31

• Haplotipos portados por los pacientes.

Figura 9

Síndrome de CREST



57

Haplotipos:

- a) A9 ,B17,DR7,DQw3,DRw53,SC61
- b) A2 ,B35,DR5,DQw1,DRw53,SC31
- c) A28,B53,DR5,DQw3,DRw52,SC30
- d) A19,B35,DR2,DQw3,DRw53,FC31

• Haplotipos portados por los pacientes.

Tabla 8. Comparaciones entre pacientes y controles
Locus A

	Frecuencia Genica		Significado Estadístico			
	Pacientes	Controles	χ^2	p	pC#	RR
	Cromosomas					
	(n=82)	(n=200)				
A1	0.146	0.072	3.42	0.064	0.103	2.11
A2	0.304	0.276	0.26	0.613	0.718	1.16
A3	0.085	0.063	0.37	0.540	0.726	1.34
A9	0.109	0.163	1.40	0.236	0.317	0.62
A10	0.073	0.056	0.34	0.560	0.759	1.36
A19	0.097	0.197	4.32	0.037	0.056	0.43

p Corregida por Yates.

• p Significativa.

** p Significativa después de corregir.

Tabla 9. Comparaciones entre pacientes y controles
Locus B

	Frecuencia Génica		Significado Estadístico			
	Pacientes	Controles	χ^2	p	pC#	RR
	Cromosomas					
	(n=82)	(n=200)				
B7	0.024	0.056	1.24	0.265	0.423	0.43
B14	0.085	0.061	0.60	0.440	0.609	1.46
B16	0.048	0.154	6.04	0.014•	0.023**	0.28
B17	0.060	0.026	2.20	0.137	0.258	2.53
B35	0.182	0.142	0.83	0.362	0.466	1.38
B53	0.036	0.010	2.36	0.124	0.298	3.76

p Corregida por Yates.

• p Significativa.

** p Significativa después de corregir.

Tabla 10. Comparaciones entre pacientes y controles
Locus DR y Complotipos

Locus DR	Frecuencia Génica		Significado Estadístico			
	Pacientes Controles Cromosomas		X ²	p	pC#	RR
	(n=82)	(n=200)				
DR1	0.134	0.092	1.23	0.267	0.372	1.57
DR2	0.047	0.126	3.66	0.055	0.089	0.36
DR4	0.166	0.253	3.08	0.079	0.109	0.55
DR5	0.231	0.103	7.67	0.005 *	0.009 **	2.57
DR7	0.097	0.092	0.04	0.842	0.978	1.09
DR8	0.035	0.161	8.15	0.004 *	0.007 **	0.20
Complotipo						
SC31	0.451	0.402	0.63	0.427	0.509	1.23
SC11	0.012	0.023	0.46	0.498	0.824	0.48
FC31	0.146	0.040	9.98	0.001 *	0.003 **	4.11
SC21	0.060	0.046	0.31	0.574	0.795	1.38
SC42	0.085	0.115	0.54	0.463	0.602	0.72

p Corregida por Yates.

* p Significativa.

** p Significativa después de corregir.

Tabla 11. Comparaciones entre pacientes y controles
Locus C4 y Factor B

Locus C4A	Frecuencia Génica		Significado Estadístico			
	Pacientes Controles Cromosomas		X ²	p	pC#	RR
	(n=82)	(n=200)				
0	0.109	0.151	0.79	0.373	0.484	0.70
1	0.012	0.010	0.03	0.870	0.634	1.22
2	0.085	0.050	1.28	0.257	0.391	1.77
3	0.670	0.600	1.24	0.266	0.328	1.36
4	0.085	0.115	0.54	0.463	0.602	0.72
Locus C4B						
0	0.060	0.118	2.20	0.138	0.205	0.48
1	0.829	0.665	7.67	0.005 *	0.008 **	2.45
2	0.097	0.143	1.15	0.283	0.380	0.64
Locus fB						
S	0.792	0.766	0.25	0.614	0.728	1.17
F	0.195	0.147	1.09	0.296	0.387	1.43

p Corregida por Yates

* p Significativa.

** p Significativa después de corregir

Al hacer la comparación entre familiares y controles se encontraron aumentadas las frecuencias del HLA-B53, -B17, -DR3 y significativamente el -DR7, además del C4A*3, C4B*1, el complotipo FC31 y el segmento DR6,SC31 (tabla 22). De la misma manera las frecuencias del HLA-B16 y el HLA-DR8 estuvieron disminuidas (tablas 12-16).

Las comparaciones entre pacientes y familiares deja ver la importancia de 2 antígenos que son el HLA-DR5 cuya frecuencia estuvo aumentada en los pacientes y el HLA-DR7 con frecuencia aumentada en los familiares ya que en cuanto a los demás alelos todos parecen presentar una frecuencia semejante en estos dos grupos (tablas 17-21) a la de la población normal mexicana.

Debido a que existe más de un antígeno de este sistema asociado a la enfermedad procedimos a realizar el análisis considerando pares de alelos y como se observa en la tabla 22 la frecuencia del segmento B35,DR5 se encuentra aumentada significativamente en los pacientes al comparar con los controles, por su parte las frecuencias de los segmentos B35,DR4 y DR2,SC31 estuvieron disminuidas en este mismo grupo. Por otro lado, en el grupo de familiares se encontraron aumentados marginalmente cuatro de estos pares de alelos.

Tabla 12. Comparación entre familiares y controles
Locus A

	Frecuencia Génica		Significado Estadístico			
	Familiares	Controles	χ^2	p	pC#	RR
	Cromosomas					
	(n=51)	(n=200)				
A1	0.078	0.072	0.01	0.934	0.830	1.05
A2	0.392	0.276	2.66	0.102	0.144	1.70
A3	0.019	0.063	1.59	0.207	0.358	0.29
A9	0.137	0.163	0.23	0.628	0.787	0.81
A19	0.078	0.197	4.15	0.041*	0.066	0.34
A28	0.078	0.122	0.71	0.399	0.553	0.62

p Corregida por Yates.

* p Significativa.

** p Significativa después de corregir.

Tabla 13. Comparación entre familiares y controles
Locus B

	Frecuencia Génica		Significado Estadístico			
	Familiares	Controles	χ^2	p	pC#	RR
	Cromosomas					
	(n=51)	(n=200)				
B5	0.095	0.092	0.03	0.859	0.924	1.10
B8	0.058	0.030	0.98	0.323	0.571	2.02
B14	0.058	0.061	0.00	0.974	0.764	0.98
B16	0.039	0.154	4.77	0.028*	0.050**	0.22
B17	0.098	0.026	5.67	0.017*	0.047**	4.24
B53	0.036	0.010	8.16	0.004*	0.019**	8.43

p Corregida por Yates.

* p Significativa.

** p Significativa después de corregir.

Tabla 14. Comparación entre familiares y controles
Locus DR

	Frecuencia Génica		Significado Estadístico			
	Familiares Controles Cromosomas		X ²	p	pC#	RR
	(n=51)	(n=200)				
DR1	0.058	0.092	0.52	0.4720	0.663	0.63
DR2	0.058	0.126	1.80	0.1800	0.275	0.44
DR3	0.137	0.046	5.80	0.0160 *	0.036 **	3.38
DR4	0.176	0.253	1.38	0.2400	0.322	0.63
DR5	0.058	0.103	1.00	0.3160	0.462	0.53
DR7	0.274	0.092	12.40	0.0004 *	0.0009 **	3.83
DR8	0.039	0.161	5.06	0.0240 *	0.043 **	0.21

p Corregida por Yates.

* p Significativa.

** p Significativa después de corregir.

Tabla 15. Comparación entre familiares y controles
Locus C4 y Factor B

Locus	Frecuencia Génica		Significado Estadístico			
	Familiares Controles Cromosomas		X ²	p	pC#	RR
	(n=51)	(n=200)				
C4A						
0	0.039	0.151	4.48	0.034 *	0.059	0.23
2	0.098	0.050	1.67	0.196	0.336	2.07
3	0.764	0.600	4.75	0.020 *	0.043 **	2.17
4	0.039	0.115	2.60	0.106	0.176	0.31
C4B						
0	0.039	0.118	2.86	0.091	0.151	0.30
1	0.090	0.665	11.15	0.0008 *	0.001 **	4.63
2	0.039	0.143	4.20	0.040 *	0.070	0.29
fB						
S	0.764	0.766	0.00	0.996	0.856	1.00
F	0.235	0.147	2.42	0.119	0.178	1.81

p Corregida por Yates.

* p Significativa.

** p Significativa después de corregir.

Tabla 16. Comparación entre familiares y controles
Complotipos

Complotipo	Frecuencia Génica		Significado Estadístico			
	Familiares	Controles	χ^2	p	pC#	RR
	Cromosomas					
(n=51)	(n=200)					
SC11	0.039	0.092	0.05	0.821	0.773	0.82
FC31	0.196	0.040	14.87	0.0001*	0.0003**	5.81
SC21	0.078	0.046	0.92	0.336	0.543	1.81
SC42	0.019	0.115	4.28	0.038*	0.071	0.15
SC31	0.509	0.402	2.01	0.156	0.208	1.56

p Corregida por Yates.

* p Significativa.

** p Significativa después de corregir.

Tabla 17. Comparación entre pacientes y familiares
Locus A

	Frecuencia Génica		Significado Estadístico			
	Pacientes	Familiares	χ^2	p	pC#	RR
	Cromosomas					
	(n=82)	(n=51)				
A1	0.146	0.078	1.37	0.241	0.369	2.01
A3	0.085	0.019	2.41	0.120	0.239	4.67
A9	0.109	0.137	0.22	0.635	0.841	0.77
A10	0.073	0.039	0.64	0.423	0.670	1.93
A19	0.097	0.078	0.14	0.708	0.949	1.27
A28	0.085	0.078	0.02	0.887	0.855	1.10

p Corregida por Yates.

* p Significativa.

** p Significativa después de corregir.

Tabla 18. Comparación entre pacientes y familiares
Locus B

	Frecuencia Génica		Significado Estadístico			
	Pacientes	Familiares	χ^2	p	pC#	RR
	Cromosomas					
	(n= 82)	(n= 51)				
B5	0.097	0.098	0.00	0.992	0.770	0.99
B8	0.060	0.058	0.00	0.959	0.745	1.04
B14	0.085	0.058	0.32	0.572	0.820	1.49
B16	0.048	0.039	0.07	0.796	0.864	1.26
B17	0.060	0.098	0.62	0.430	0.652	0.60
B35	0.182	0.117	1.01	0.315	0.447	1.68
B53	0.036	0.078	1.10	0.293	0.514	0.45

p Corregida por Yates.

• p Significativa.

** p Significativa después de corregir.

Tabla 19. Comparación entre pacientes y familiares
Locus DR

	Frecuencia Génica		Significado Estadístico			
	Pacientes	Familiares	χ^2	p	pC#	RR
	Cromosomas					
	(n= 82)	(n= 51)				
DR1	0.134	0.058	1.89	0.168	0.277	2.48
DR2	0.048	0.058	0.06	0.800	0.883	0.82
DR3	0.060	0.137	2.23	0.135	0.237	0.41
DR4	0.158	0.176	0.07	0.786	0.975	0.88
DR5	0.231	0.058	6.81	0.009 •	0.017 **	4.83
DR7	0.097	0.274	7.13	0.007 •	0.015 **	0.29
DR8	0.036	0.039	0.01	0.938	0.695	0.93

p Corregida por Yates.

• p Significativa.

** p Significativa después de corregir.

Tabla 20. Comparación entre pacientes y familiares
Locus C4 y Factor B

	Frecuencia Génica		Significado Estadístico			
	Pacientes	Familiares	X ²	p	pC#	RR
	Cromosomas					
	(n=82)	(n=51)				
Locus C4A						
0	0.109	0.039	2.06	0.150	0.265	3.02
2	0.085	0.098	0.06	0.804	0.949	0.86
3	0.670	0.764	1.34	0.247	0.336	0.63
4	0.085	0.039	1.06	0.302	0.499	2.29
Locus C4B						
0	0.060	0.039	0.30	0.584	0.883	1.59
1	0.829	0.900	1.36	0.244	0.362	0.53
2	0.097	0.039	1.54	0.214	0.366	2.65
Locus fB						
S	0.792	0.764	0.14	0.703	0.869	1.18
F	0.195	0.235	0.31	0.580	0.738	0.79

p Corregida por Yates.

• p Significativa.

** p Significativa después de corregir.

Tabla 21. Comparación entre pacientes y familiares
Complotipos

	Frecuencia Génica		Significado Estadístico			
	Pacientes	Familiares	X ²	p	pC#	RR
	Cromosomas					
	(n=82)	(n=51)				
SC11	0.012	0.019	0.12	0.732	0.695	0.62
FC31	0.146	0.196	0.56	0.452	0.609	0.70
SC21	0.060	0.078	0.15	0.696	0.972	0.76
SC42	0.085	0.019	2.41	0.120	0.239	4.67
SC31	0.451	0.509	0.43	0.510	0.631	0.79

p Corregida por Yates.

• p Significativa.

** p Significativa después de corregir.

Tabla 22. Comparaciones significativas en dos alelos de pacientes con escleroderma

	Frecuencia Génica		Significado Estadístico			
	Pacientes	Controles	X ²	p	pC#	RR
	Cromosomas	Cromosomas				
	(n=82)	(n=200)				
B35,DR5	0.097	0.020	8.59	0.003 ·	0.009 ..	5.30
B35,DR4	0.011	0.069	3.86	0.049 ·	0.094	0.16
DR2,SC31	0.023	0.092	3.80	0.051	0.090	0.25
	Familiares Controles					
	(n=51)	(n=200)				
B17,DR7	0.081	0.020	4.50	0.033 #	0.094	4.17
DR6,SC31	0.081	0.020	4.50	0.033 ·	0.094	4.17
DR7,FC31	0.081	0.020	4.50	0.033 ·	0.094	4.17
DR7,SC31	0.081	0.020	4.50	0.033 ·	0.094	4.17

p Corregida por Yates.

· p Significativa. .. p Significativa después de corregir.

En las tablas 23, 24 y 25 se muestra en resumen los alelos y segmentos aumentados y disminuidos en cuanto a su frecuencia al hacer todas las comparaciones entre pacientes, familiares y controles.

En las tablas 26a y 26b se muestran los haplotipos de los pacientes con escleroderma de tal forma que uno puede apreciar la presencia de 5 haplotipos posiblemente extendidos o segmentos de ellos, dichos haplotipos son:

- 1.- A2,B35,DR5,DQw3,DRw52,SC31
- 2.- A2,B5 ,DR4,DQw3,DRw53,SC31
- 3.- A1,B17,DR7,DQw2,DRw53,SC61
- 4.- , ,DR1,DQw1,DRw53,SC31
- 5.- A1, ,DR3,DQw2,DRw52,SC31

Es claro que la mayoría de los pacientes llevan uno u otro de esos haplotipos extendidos ya sea en el cromosoma base o en el cromosoma homólogo y algunos llevan un segmento marcador de algún haplotipo extendido.

Estos haplotipos o segmentos están presentes en 56 cromosomas de un total de 82 en los pacientes, es decir, en el 68.2%. La mayoría de ellos incluyen el segmento DR-DQ-Complotipo habiendo solo un caso que incluye solo al DR (paciente 31) siendo este marcado por el DR7.

De los 5 haplotipos extendidos, los dos primeros parecen ser de origen autóctono con frecuencias menores a 0.02 en nuestra población, mientras que el tercero es un haplotipo caucásico ya reportado con una frecuencia de 0.028 en esa población y que al parecer tiene una deficiencia en el C4B (SC61). Como puede verse el haplotipo DR1,DQw1,DRw53,SC31 marcado por el DR1 se encuentra primordialmente en el cromosoma homólogo. Por otro lado, el haplotipo A1,DR3,DQw2,DRw52,SC31 que va con DR3 parece presentarse en forma homocigota en esos pacientes.

De los 56 haplotipos extendidos o segmentos, 18 (32.1%) incluyen al locus del HLA-A.

De los 56, 37 (66.0%) están en el cromosoma base y sólo 19 (33.9%) están en el cromosoma homólogo.

De los alelos cuya frecuencia se encontró aumentada por separado en los pacientes (DR5, FC31 y C4B*1) solo el DR5 y el C4B*1 estuvieron a su vez incluidos en los haplotipos extendidos ya descritos, mientras que el FC31 no forma parte de ellos.

Los 56 haplotipos extendidos o segmentos estuvieron distribuidos de la siguiente forma:

Marcados por DR5 19 (33.9%)

DR4 13 (23.2%)

DR7 8 (14.2%)

DR1 11 (19.6%)

DR3 5 (8.9%)

De los 41 pacientes, 19 (46.3%) son homocigotos para algún haplotipo extendido o fragmento, los restantes 22 (53.6%) solo tienen el haplotipo extendido o fragmento en uno de sus cromosomas. Estos últimos presentan en su cromosoma homólogo básicamente DR6 (7), DR8(3) y DR2(3).

Tabla 23. Comparación pacientes vs controles.

Aumentados		Disminuidos	
DR5	p=0.005 RR=2.57	A19	p=0.037 RR=0.43
FC31	p=0.001 RR=4.11	B16	p=0.014 RR=0.28
C4B*1	p=0.005 RR=2.45	DR8	p=0.004 RR=0.20
69 B35,DR5	p=0.003 RR=5.30		

Tabla 24. Comparación familiares vs controles.

Aumentados		Disminuidos	
B17	p=0.017 RR=4.24	B16	p=0.028 RR=0.22
B53	p=0.004 RR=8.43	DR8	p=0.024 RR=0.21
DR3	p=0.016 RR=3.38		
DR7	p=0.0004 RR=3.83		
FC31	p=0.0001 RR=5.81		
C4B*1	p=0.0008 RR=4.63		
DR6,SC31	p=0.007 RR=5.33		

Tabla 25. Comparación pacientes vs familiares

Aumentado		Disminuido	
DR5	p=0.009 RR=4.83	DR7	p=0.007 RR=0.29

Tabla 26a. Haplotipos extendidos o fragmentos en el cromosoma base
y en el homólogo de los pacientes con escleroderma.

Alelos en el cromosoma base

Alelos en el cromosoma homólogo

	A	B	DR	DQ	DRw	COM		A	B	DR	DQ	DRw	COM
1.-	<u>2</u>	<u>35</u>	<u>5</u>	<u>3</u>	<u>52</u>	<u>SC31</u>		<u>2</u>	<u>18</u>	<u>1</u>	<u>4</u>	<u>53</u>	<u>SC31</u>
2.-	<u>2</u>	<u>35</u>	<u>5</u>	<u>3</u>	<u>52</u>	<u>SC31</u>		28	35	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>53</u>	SC42
3.-	<u>2</u>	<u>35</u>	<u>5</u>	1	53	<u>SC31</u>		28	53	<u>5</u>	<u>3</u>	<u>52</u>	SC30
4.-	<u>2</u>	<u>35</u>	<u>5</u>	4	<u>52</u>	SC33		X	8	<u>1</u>	<u>1</u>	<u>53</u>	SC01
5.-	28	<u>35</u>	<u>5</u>	1	<u>52</u>	<u>SC31</u>		3	35	<u>4</u>	<u>3</u>	<u>53</u>	<u>SC31</u>
6.-	3	<u>35</u>	<u>5</u>	1	<u>52</u>	FC31		36	<u>35</u>	<u>5</u>	1	<u>52</u>	FC30
7.-	19	<u>35</u>	<u>5</u>	3	53	SC01		<u>1</u>	<u>17</u>	<u>7</u>	1	<u>53</u>	SC31
8.-	<u>2</u>	40	<u>5</u>	3	<u>52</u>	SC30		1	40	<u>4</u>	<u>3</u>	<u>53</u>	<u>SC31</u>
9.-	<u>2</u>	40	<u>5</u>	2	<u>52</u>	SC42		9	42	<u>1</u>	<u>1</u>	<u>53</u>	<u>SC31</u>
10.-	28	40	<u>5</u>	3	<u>52</u>	SC01		9	14	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>53</u>	SC21
11.-	1	13	<u>5</u>	3	<u>52</u>	<u>SC31</u>		<u>1</u>	8	<u>7</u>	<u>2</u>	<u>52</u>	FC31
12.-	19	8	<u>5</u>	3	<u>52</u>	<u>SC31</u>		9	40	<u>4</u>	<u>3</u>	<u>53</u>	FC31
13.-	X	53	<u>5</u>	3	<u>52</u>	<u>SC31</u>		2	8	6	1	52	SC01
14.-	10	12	<u>5</u>	3	<u>52</u>	SC42		19	15	9	1	53	SC31
15.-	9	21	<u>5</u>	3	<u>52</u>	FC31		1	37	<u>1</u>	<u>1</u>	<u>53</u>	SC01
16.-	9	41	<u>5</u>	1	53	<u>SC31</u>		2	7	2	1	52	FC31
17.-	10	22	<u>5</u>	<u>3</u>	53	FC31		<u>2</u>	<u>35</u>	<u>1</u>	<u>1</u>	<u>52</u>	<u>FC31</u>
18.-	<u>2</u>	5	4	3	53	<u>SC31</u>		3	14	8	1	52	SC11
19.-	19	<u>5</u>	4	3	53	<u>SC31</u>		X	X	X	X	X	S1C02
20.-	2	14	<u>4</u>	3	<u>53</u>	<u>SC31</u>		2	14	<u>7</u>	1	52	FC30
21.-	9	17	<u>4</u>	3	<u>53</u>	<u>SC31</u>		<u>2</u>	8	<u>1</u>	<u>1</u>	<u>52</u>	<u>FC21</u>

Tabla 26b. Continuación de la anterior.

	Alelos en el cromosoma base					Alelos en el cromosoma homólogo						
	A	B	DR	DQ	DRw	COM	A	B	DR	DQ	DRw	COM
22.-	19	16	<u>4</u>	<u>3</u>	<u>53</u>	SC31	9	35	<u>7</u>	<u>2</u>	<u>53</u>	SC31
23.-	10	14	<u>4</u>	<u>3</u>	<u>53</u>	SC21	X	X	X	X	X	S1C02
24.-	11	16	<u>4</u>	<u>3</u>	<u>53</u>	SC42	2	21	8	1	52	SC42
25.-	19	37	<u>4</u>	<u>3</u>	<u>53</u>	FC31	2	21	6	4	53	SC31
26.-	28	X	<u>4</u>	<u>3</u>	<u>53</u>	FC31	1	15	6	1	52	SC01
27.-	9	18	<u>4</u>	<u>2</u>	<u>53</u>	SC21	2	5	6	1	52	SC31
28.-	<u>1</u>	17	<u>7</u>	<u>2</u>	<u>53</u>	SC61	2	21	X	X	X	SC31
29.-	28	17	<u>7</u>	<u>2</u>	<u>53</u>	SC61	1	35	10	1	52	SC31
30.-	<u>1</u>	21	<u>7</u>	<u>1</u>	<u>53</u>	FC31	3	40	8	3	52	SC31
31.-	2	5	<u>7</u>	<u>3</u>	<u>52</u>	SC42	2	15	<u>3</u>	<u>1</u>	<u>52</u>	SC01
32.-	<u>2</u>	14	<u>1</u>	<u>1</u>	<u>53</u>	FC21	3	14	9	1	52	FC31
33.-	11	35	<u>1</u>	<u>1</u>	<u>53</u>	SC31	3	35	2	1	53	SC31
34.-	3	5	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>53</u>	FC31	2	5	2	1	53	SC21
35.-	<u>1</u>	5	<u>3</u>	<u>2</u>	<u>52</u>	SC31	10	53	X	X	X	SC30
36.-	<u>1</u>	16	<u>3</u>	<u>2</u>	<u>52</u>	SC31	2	22	6	1	52	SC42
37.-	19	18	<u>3</u>	<u>1</u>	<u>52</u>	SC31	10	15	<u>3</u>	<u>1</u>	<u>52</u>	SC01
38.-	9	22	2	1	52	SC31	11	5	6	3	52	SC31
39.-	2	12	X	X	X	SC31	28	7	X	X	X	SC21
40.-	11	17	X	X	X	SC31	1	21	X	X	X	FC51
41.-	10	21	X	X	X	SC31	2	15	X	X	X	SC31

En la tabla 27 se muestran las frecuencias de los haplotipos extendidos o segmentos en pacientes y se comparan con la población normal mexicana. Como puede observarse, el HLA-DR5 es más significativo cuando incluye al -B35; el -DR4 y -DR4,SC31 están disminuidos en los pacientes pero al incluir al -B5 aumentan pero sin llegar a ser significativos; el -DR7 es más significativo cuando incluye al -B17 y el -DR3 cuando incluye al SC31. El único que no sigue este patrón es el DR1, el cual, es más significativo cuando está solo. Todo lo anterior se observa gráficamente en las figuras 10a y 10b que incluyen a los 4 haplotipos con ese patrón de aumento.

Tabla 27. Frecuencia de haplotipos extendidos o segmentos en pacientes con escleroderma y controles.

Haplotipo o segmento	Frecuencia Génica		Significado Estadístico		
	Pacientes	Controles	X^2	p	RR
	(n=82)	(n=200)			
B35,DR5,SC31	0.048	0.020	1.75	0.186	2.51
B35,DR5	0.097	0.020	8.59	0.003 *	5.30
DR5,SC31	0.097	0.046	2.84	0.092	2.29
DR5	0.231	0.103	7.67	0.005 *	2.57
B5,DR4,SC31	0.024	0.020	0.05	0.816	1.22
B5,DR4	0.024	0.020	0.05	0.816	1.22
DR4,SC31	0.085	0.160	2.72	0.099	0.49
DR4	0.158	0.253	3.08	0.079	0.55
B17,DR7,SC61	0.024	0.020	0.05	0.816	1.22
B17,DR7	0.036	0.020	0.66	0.416	1.86
DR7,SC61	0.024	0.020	0.05	0.816	1.22
DR7	0.097	0.092	0.04	0.842	1.09
DR1,SC31	0.036	0.020	0.66	0.416	1.22
DR1	0.134	0.092	1.23	0.267	1.09
A1,DR3,SC31	0.024	0.020	0.05	0.816	1.22
A1,DR3	0.024	0.020	0.05	0.816	1.22
DR3,SC31	0.036	0.020	0.66	0.416	1.86
DR3	0.060	0.046	0.31	0.574	1.38

* p Significativa después de corregir la p.

Figura 10a. Haplotipos extendidos y sus fragmentos en la escleroderma.

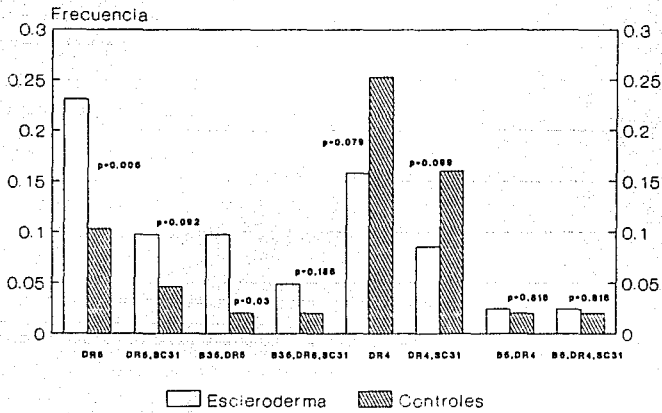
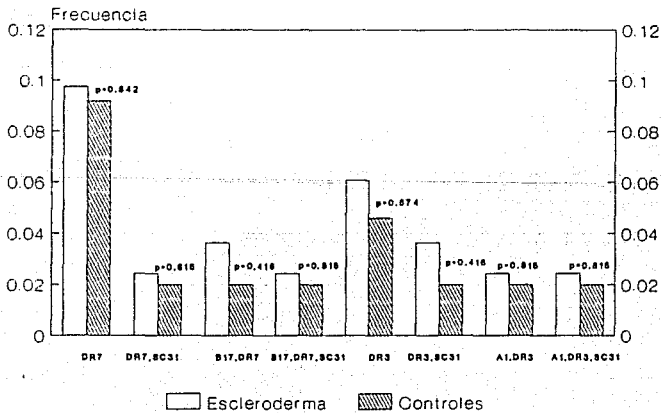
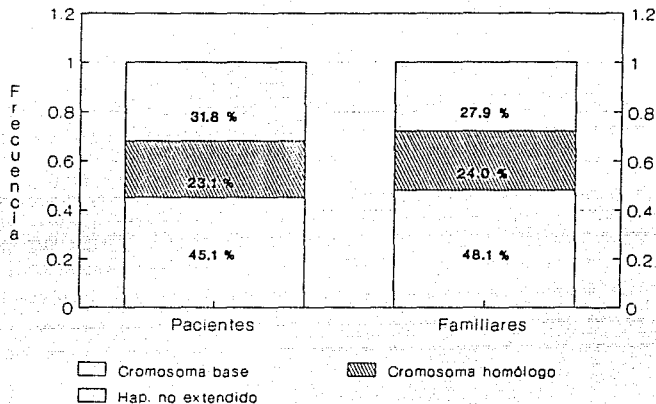


Figura 10b. Haplotipos extendidos y sus fragmentos en la escleroderma.



La comparación entre la frecuencia de estos haplotipos extendidos o segmentos en el cromosoma base o en el homólogo en pacientes y familiares no presenta diferencias significativas (figura 11).

Figura 11. Frecuencia de haplotipos extendidos y fragmentos en ambos cromosomas



	Pacientes (n = 82)	Familiares (n = 54)
Cromosoma base	0.451	0.481
Cromosoma homólogo	0.231	0.240
Hap. no extendidos	0.318	0.279

Una vez realizado el análisis de la enfermedad en general, los 41 pacientes se separaron de acuerdo al subtipo clínico, de tal forma que nuestro grupo incluyó a 22 pacientes con escleroderma difusa, 11 con síndrome de CREST, 5 con escleroderma localizada y 3 con síndrome de Reynolds.

En las tablas 28a y 28b se muestran las comparaciones de frecuencias genotípicas entre los controles y pacientes con los diferentes subtipos clínicos. Como puede observarse en escleroderma difusa las frecuencias del HLA-DR5, del alelo FC31, del alelo C4B*1 y del segmento B35,DR5 se encontraron aumentadas significativamente, mientras que las frecuencias del HLA-B16 y del -DR8, estuvieron disminuidas. De la misma manera la frecuencia del HLA-DR5 también estuvo aumentada significativamente en escleroderma localizada. Por otro lado, en el síndrome de CREST solo estuvo aumentada marginalmente la frecuencia del HLA-B53 y en el síndrome de Reynolds la frecuencia del alelo C4B*2.

En la tabla 29 se muestran los haplotipos extendidos ó segmentos en el cromosoma base y en el homólogo de los pacientes con escleroderma difusa. De los 44 cromosomas 31 (70.4%) presentan cualquiera de los anteriores 5 haplotipos extendidos ó fragmentos descritos, de éstos, 19 (43.1%) estuvieron en el cromosoma base y 12 (27.2%) en el cromosoma homólogo. De los 22 pacientes 12 (54.5%) fueron homocigotos para algunos de los haplotipos extendidos ó segmentos, mientras que los restantes 10 (45.5%) sólo presentaron haplotipo extendido ó segmento en uno de los cromosomas teniendo en el homólogo básicamente DR6 (3) y DR2 (2).

Tabla 28a. Comparación de frecuencias genotípicas entre pacientes con escleroderma difusa y controles.

	Frecuencia Génica		Significado Estadístico			
	Pacientes	Controles	χ^2	p	pC*	RR
	Cromosomas					
	(n=44)	(n=200)				
Aumentados						
DR5	0.250	0.103	6.65	0.009	0.019**	2.84
FC31	0.136	0.040	6.19	0.012	0.033**	3.79
C4B*1	0.886	0.665	8.50	0.003	0.006**	3.93
B35,DR5	0.136	0.020	12.42	0.0004	0.001**	7.74
Disminuidos						
B16	0.022	0.154	5.54	0.018	0.035**	0.13
DR8	0.022	0.161	5.81	0.015	0.030**	0.12

* p Corregida por Yates.

** p Significativa después de corregir.

Solo se muestran los datos significativos.

Tabla 28b. Comparación de frecuencias genotípicas entre pacientes con síndrome de CREST, escleroderma localizada, síndrome de Reynolds y controles

Síndrome de Crest						
	Pacientes	Controles	χ^2	p	pC*	RR
	(n=22)	(n=200)				
B53	0.090	0.010	7.33	0.006	0.060	9.90
Escleroderma Localizada						
	Pacientes	Controles	χ^2	p	pC*	RR
	(n=10)	(n=200)				
DR5	0.400	0.103	7.90	0.004	0.020*	5.68
Síndrome de Reynolds						
	Pacientes	Controles	χ^2	p	pC*	RR
	(n=6)	(n=200)				
C4B*2	0.500	0.143	5.60	0.018	0.072	5.90

* p Corregida por Yates.

Tabla 29. Haplotipos extendidos y fragmentos en ambos cromosomas de pacientes con escleroderma difusa.

Alelos en el cromosoma base							Alelos en el cromosoma homólogo					
	A	B	DR	DQ	DRw	COM	A	B	DR	DQ	DRw	COM
1.-	<u>2</u>	<u>35</u>	<u>5</u>	<u>3</u>	<u>52</u>	<u>SC31</u>	<u>2</u>	18	<u>1</u>	4	<u>53</u>	<u>SC31</u>
2.-	<u>2</u>	<u>35</u>	<u>5</u>	<u>3</u>	<u>52</u>	<u>SC31</u>	28	<u>35</u>	<u>1</u>	2	<u>53</u>	SC42
3.-	<u>2</u>	<u>35</u>	<u>5</u>	<u>4</u>	<u>52</u>	<u>SC33</u>	X	8	<u>1</u>	1	<u>53</u>	SC31
4.-	28	<u>35</u>	<u>5</u>	<u>1</u>	<u>52</u>	<u>SC31</u>	3	<u>35</u>	<u>4</u>	<u>3</u>	<u>53</u>	<u>SC31</u>
5.-	3	<u>35</u>	<u>5</u>	<u>1</u>	<u>52</u>	<u>FC31</u>	36	<u>35</u>	<u>5</u>	<u>1</u>	<u>52</u>	SC30
6.-	1	13	<u>5</u>	<u>3</u>	<u>52</u>	<u>SC31</u>	<u>1</u>	8	<u>7</u>	<u>2</u>	<u>52</u>	FC31
7.-	19	8	<u>5</u>	<u>3</u>	<u>52</u>	<u>SC31</u>	9	<u>40</u>	<u>4</u>	<u>3</u>	<u>53</u>	FC31
8.-	X	63	<u>5</u>	<u>3</u>	<u>52</u>	<u>SC31</u>	2	8	<u>6</u>	<u>1</u>	<u>52</u>	SC01
9.-	28	<u>40</u>	<u>5</u>	<u>3</u>	<u>52</u>	<u>SC01</u>	9	<u>14</u>	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>53</u>	SC21
10.-	9	<u>41</u>	<u>5</u>	<u>1</u>	<u>53</u>	<u>SC31</u>	2	7	<u>2</u>	<u>1</u>	<u>52</u>	FC31
11.-	<u>2</u>	<u>5</u>	<u>4</u>	<u>3</u>	<u>53</u>	<u>SC31</u>	29	<u>16</u>	<u>6</u>	<u>1</u>	<u>52</u>	SC31
12.-	19	<u>5</u>	<u>4</u>	<u>3</u>	<u>53</u>	<u>SC31</u>	<u>2</u>	8	<u>1</u>	<u>1</u>	<u>52</u>	FC21
13.-	2	14	<u>4</u>	<u>3</u>	<u>53</u>	<u>SC31</u>	3	14	<u>8</u>	<u>1</u>	<u>52</u>	SC11
14.-	9	17	<u>4</u>	<u>3</u>	<u>53</u>	<u>SC31</u>	2	14	<u>7</u>	<u>1</u>	<u>52</u>	FC30
15.-	<u>1</u>	17	<u>7</u>	<u>2</u>	<u>53</u>	<u>SC81</u>	2	21	X	X	X	SC31
16.-	2	5	<u>7</u>	<u>3</u>	<u>52</u>	<u>SC42</u>	2	15	<u>3</u>	<u>1</u>	<u>52</u>	SC01
17.-	<u>2</u>	14	<u>1</u>	<u>1</u>	<u>53</u>	<u>FC21</u>	3	14	<u>9</u>	<u>1</u>	<u>52</u>	FC31
18.-	3	5	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>53</u>	<u>FC31</u>	2	5	<u>2</u>	<u>1</u>	<u>53</u>	SC21
19.-	19	18	<u>3</u>	<u>1</u>	<u>52</u>	<u>SC31</u>	10	15	<u>3</u>	<u>1</u>	<u>52</u>	SC01
20.-	9	22	<u>2</u>	<u>1</u>	<u>52</u>	<u>SC31</u>	11	5	<u>6</u>	<u>3</u>	<u>52</u>	SC31
21.-	11	17	X	X	X	SC31	1	21	X	X	X	FC51

De los 15 familiares de este grupo (30 cromosomas), 23 (76.6%) presentaron haplotipos extendidos o segmentos, de los cuales, 15 (50.0%) estuvieron en el cromosoma base y los 8 restantes (26.6%) se localizaron en el homólogo. De los 15 familiares, 8 (53.3%) fueron homocigotos para alguno de los haplotipos extendidos o segmentos, mientras que los restantes 7 (46.6%) presentaron sólo el haplotipo extendido o segmento en uno de los cromosomas destacando la presencia de DR6 y DR8 en el cromosoma homólogo.

En este grupo de pacientes, de los 31 haplotipos extendidos o segmentos 9 (29.0%) incluyen el locus del HLA-A.

La comparación entre pacientes y familiares de este grupo con respecto a la presencia de haplotipos extendidos o segmentos en el cromosoma base y en el homólogo muestra que ambos son muy semejantes.

En estos pacientes con la variedad generalizada básicamente se presentaron 3 de los 5 haplotipos o segmentos descritos:

- 1.- B35,DR5,DQw3,DRw52,SC31.
- 2.- B5 ,DR4,DQw3,DRw53,SC31.
- 3.- B17,DR7,DQw2,DRw53,SC61.

La comparación en cuanto a la frecuencia de estos haplotipos o segmentos en pacientes con escleroderma difusa y controles es mostrada en la tabla 30.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

Tabla 30. Frecuencia de haplotipos extendidos o segmentos en pacientes con escleroderma difusa y controles.

Haplotipo o Segmento	Frecuencia Génica		Significado Estadístico		
	Esc. Difusa	Controles	X^2	p	RR
	Cromosomas				
	(n=44)	(n=200)			
B35,DR5,SC31	0.068	0.020	3.00	0.083	3.59
B35,DR5	0.136	0.020	12.42	0.0004 *	7.74
DR5,SC31	0.159	0.046	7.66	0.005 *	4.02
DR5	0.227	0.103	4.86	0.027 *	2.51
B5,DR4,SC31	0.045	0.020	0.97	0.323	2.33
B5,DR4	0.045	0.020	0.97	0.323	2.33
DR4,SC31	0.113	0.160	0.60	0.437	0.67
DR4	0.136	0.253	2.84	0.092	0.46
B17,DR7,SC61	0.022	0.020	0.01	0.907	1.14
B17,DR7	0.022	0.020	0.01	0.907	1.14
DR7,SC61	0.022	0.020	0.01	0.907	1.14
DR7	0.090	0.092	0.00	0.984	1.01

* p significativa después de corregir.

Al igual que en el análisis de la enfermedad en general también aquí los datos más significativos incluyen segmentos ó haplotipos completos. El HLA-DR5 es más significativo cuando incluye al HLA-B35; las frecuencias del HLA-DR4 y del -DR4,SC31 están disminuidas en los pacientes pero al incluir el HLA-B5 y SC31 dicha frecuencia aumenta aunque sin alcanzar significado estadístico y finalmente el HLA-DR7 es más significativo cuando incluye el HLA-B17 y SC61. Todo lo anterior se observa gráficamente en las figuras 12, 13 y 14.

La comparación de frecuencias de haplotipos extendidos o segmentos en el cromosoma base y homólogo de pacientes y familiares no presentan ninguna diferencia.

La tabla 31 muestra los haplotipos extendidos o segmentos en los pacientes con síndrome de CREST ya sea en el cromosoma base o en el homólogo. De los 22 cromosomas en este grupo, 12 (54.5%) presentan cualquiera de los 5 haplotipos extendidos o segmentos descritos anteriormente, de estos 22, 10 (45.4%) estaban en el cromosoma base y solo 2 (9.0%) en el cromosoma homólogo. De los 11 pacientes solo 2 (18.1%) fueron homocigotos para alguno de los haplotipos extendidos o segmentos, mientras que los 9 restantes (81.8%) sólo presentaron haplotipos extendidos o segmentos en uno de sus cromosomas teniendo en el cromosoma homólogo básicamente DR6 (3).

Figura 12. frecuencia del haplotipo B35,DR5,SC31 o sus segmentos en pacientes con escleroderma difusa y controles.

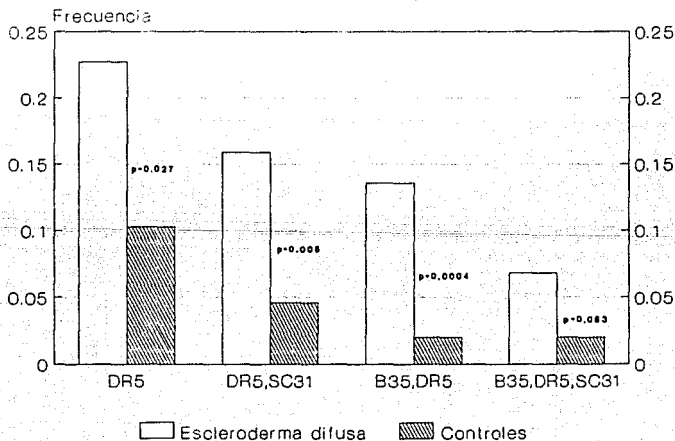


Figura 13. Frecuencia del haplotipo B5,DR4,SC31 o sus segmentos en pacientes con escleroderma difusa y controles.

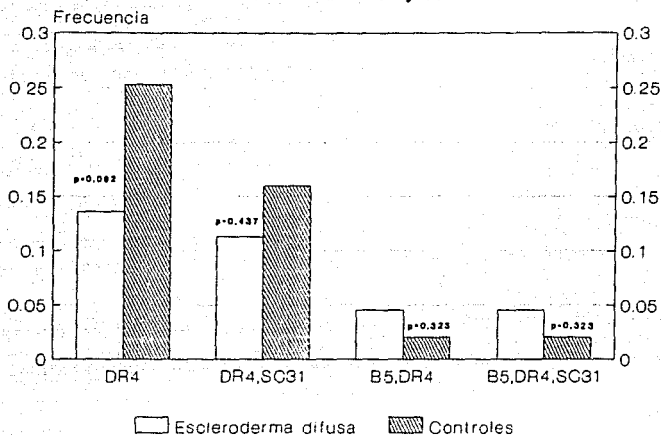


Figura 14. Frecuencia del haplotipo B17,DR7,SC61 o sus segmentos en pacientes con escleroderma difusa y controles.

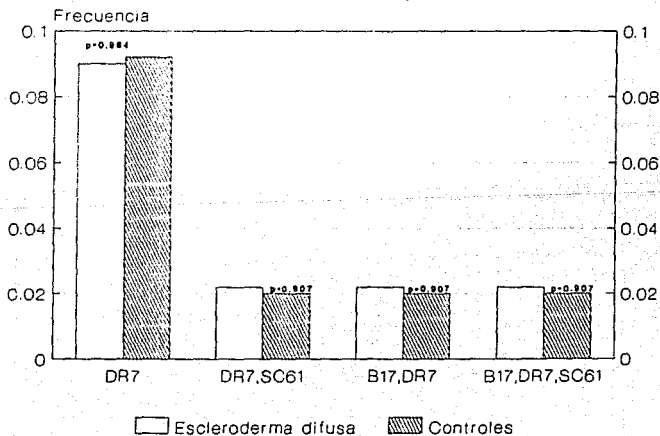


Tabla 31. Haplotipos extendidos y fragmentos en pacientes con síndrome de CREST.

	alelos en el cromosoma base						alelos en el cromosoma homólogo					
	A	B	DR	DQ	DRw	COM	A	B	DR	DQ	DRw	COM
1.-	<u>2</u>	<u>35</u>	<u>5</u>	<u>1</u>	<u>53</u>	<u>SC31</u>	28	53	<u>5</u>	<u>3</u>	<u>52</u>	SC30
2.-	10	12	<u>5</u>	<u>3</u>	<u>52</u>	SC42	19	15	9	1	53	SC31
3.-	19	16	<u>4</u>	<u>3</u>	<u>53</u>	<u>SC31</u>	9	35	<u>7</u>	<u>2</u>	<u>53</u>	SC31
4.-	19	37	<u>4</u>	<u>3</u>	<u>53</u>	FC31	2	21	6	4	53	SC31
5.-	28	X	<u>4</u>	<u>3</u>	<u>53</u>	FC31	1	15	6	1	52	SC01
6.-	28	<u>17</u>	<u>7</u>	<u>2</u>	<u>53</u>	<u>SC61</u>	3	40	8	3	52	SC31
7.-	<u>1</u>	21	<u>7</u>	<u>1</u>	<u>53</u>	FC31	1	35	10	1	52	SC31
8.-	11	35	<u>1</u>	<u>1</u>	<u>53</u>	<u>SC31</u>	3	35	2	1	53	SC31
9.-	<u>1</u>	5	<u>3</u>	<u>2</u>	<u>52</u>	<u>SC31</u>	10	53	X	X	X	SC30
10.-	<u>1</u>	16	<u>3</u>	<u>2</u>	<u>52</u>	<u>SC31</u>	2	22	6	1	52	SC42
11.-	2	12	X	X	X	SC31	28	7	X	X	X	SC21

En este grupo de pacientes de los 12 haplotipos extendidos o segmentos solo 4 (33.3%) incluían al locus del HLA-A.

Los haplotipos de los pacientes con escleroderma localizada y síndrome de Reynolds son mostrados en la tabla 32 pero su análisis por haplotipos extendidos o segmentos no se considera debido al bajo número de pacientes que incluye cada grupo.

La presencia de haplotipos extendidos o segmentos en el cromosoma base y en el homólogo parece ser diferente según el subtipo clínico de la enfermedad, razón por la cual, se compara la frecuencia de estos haplotipos extendidos o segmentos en escleroderma difusa y síndrome de CREST. Como puede observarse, la frecuencia de haplotipos extendidos o segmentos en el cromosoma base es semejante en ambos grupos (43.1% vs 45.4%), sin embargo, la presencia de estos mismos haplotipos en el cromosoma homólogo es diferente (27.2% vs 9.0%) y por tanto la presencia de haplotipos no extendidos también resulta diferente existiendo más en los pacientes con el síndrome de CREST (45.4% vs 29.5%).

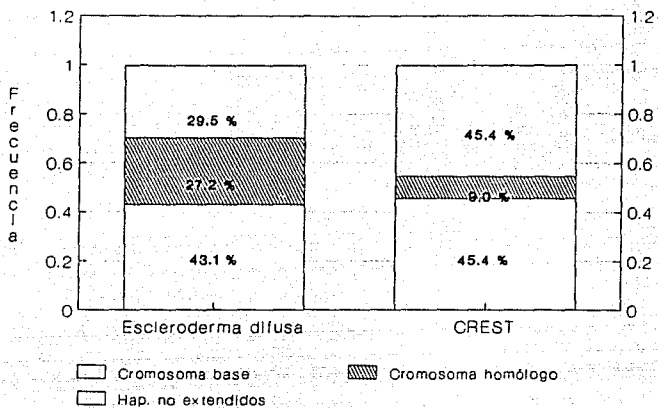
El análisis estadístico de esta comparación es mostrado en la figura 15 y como puede observarse ninguna diferencia es finalmente significativa.

Es importante señalar que la relación del HLA con la severidad de la enfermedad así como su relación con la presencia de autoanticuerpos no fue el objetivo central de este trabajo, sin embargo, sería importante definir estas relaciones en nuestro grupo de pacientes.

Tabla 32. Haplotipos extendidos y fragmentos en escleroderma localizada
síndrome de Reynolds.

Escleroderma localizada (cromosoma base)							Escleroderma localizada (cromosoma homólogo)					
	A	B	DR	DQ	DRw	COM	A	B	DR	DQ	DRw	COM
1.-	<u>2</u>	40	<u>5</u>	<u>3</u>	<u>52</u>	SC30	1	40	<u>4</u>	<u>3</u>	<u>53</u>	<u>SC31</u>
2.-	<u>2</u>	40	<u>5</u>	2	<u>52</u>	SC42	9	42	<u>1</u>	<u>1</u>	<u>53</u>	<u>SC31</u>
3.-	19	<u>35</u>	<u>5</u>	<u>3</u>	53	SC01	<u>1</u>	<u>17</u>	<u>7</u>	<u>1</u>	<u>53</u>	SC31
4.-	9	21	<u>5</u>	<u>3</u>	<u>52</u>	FC31	1	37	<u>1</u>	<u>1</u>	<u>53</u>	SC01
5.-	9	18	4	2	53	SC21	2	5	6	1	52	SC31
Síndrome de Reynolds (cromosoma base)							Síndrome de Reynolds (cromosoma homólogo)					
	A	B	DR	DQ	DRw	COM	A	B	DR	DQ	DRw	COM
1.-	10	22	<u>5</u>	<u>3</u>	53	FC31	<u>2</u>	35	<u>1</u>	<u>1</u>	52	FC31
2.-	10	14	<u>4</u>	<u>3</u>	<u>53</u>	SC21	X	X	X	X	X	S1C02
3.-	11	16	<u>4</u>	<u>3</u>	<u>53</u>	SC42	2	21	8	1	52	SC42

Figura 15. Comparación de frecuencias de haplotipos extendidos en escleroderma difusa y síndrome de CREST.



	Escleroderma difusa (n=44)	Síndrome de CREST (n=22)	Cromosomas		
			X^2	p	RR
Crom. base	0.431	0.454	0.03	0.860	0.97
Crom. homólogo	0.272	0.090	2.90	0.088	1.39
Hap. no extendido	0.295	0.454	1.63	0.201	0.78

VIII. DISCUSION.

La genética de la escleroderma implica varios hechos importantes que han venido siendo estudiados paulatinamente, entre éstos están la presencia de la enfermedad en más de un miembro en una misma familia, además de que la frecuencia es más elevada en mujeres que en hombres con una relación aproximada de 3:1 (64). La frecuencia de anticuerpos antinucleares en familiares de pacientes también ha sido reportada fluctuando entre un 12 y 58 %, la diferencia parece deberse a la utilización de diferentes sustratos en la determinación; entre los hallazgos a nivel de ruptura de cromosomas e intercambio de crómátides hermanas el más importante es el hecho de que dichas rupturas segregan en forma mendeliana junto con el haplotipo A1,B8,DR3,Cw7,SC01 en individuos caucásicos sugiriendo la importancia de los antígenos del SPH en la susceptibilidad a la enfermedad.

Existen varias enfermedades que sin ser propiamente escleroderma, comparten con ella muchas características, tal es el caso de la enfermedad fibrótica inducida por cloruro de vinilo, la cual, se encontró asociada con el HLA-DR5, nuevamente apoyando la noción de participación de las moléculas clase II en la enfermedad.

Una vez iniciados los estudios de asociación enfocados a los antígenos del SPH se han encontrado asociaciones muy heterogeneas destacando básicamente las que involucran a los antígenos clase II (DR3, DR1, DR5, DRw11, DRw8) y a la presencia de alelos nulos en C4A y C4B (clase III).

Cabe hacer notar que nosotros sólo encontramos aumentada la frecuencia del HLA-DR5 en nuestros pacientes, mientras que la frecuencia del HLA-DR8 estuvo disminuida. De los antígenos clase I observamos una frecuencia disminuida del HLA-A19 y del HLA-B16 que son de los antígenos más frecuentes en nuestra población (0.197 y 0.154 respectivamente). En nuestro grupo de pacientes no se encontró la presencia de alelos nulos pero si se encontró una alta frecuencia del C4B*1. Un hecho que llama la atención es el aumento en la frecuencia del complotipo FC31, el cual, nosotros hemos encontrado también en pacientes con artritis reumatoide y espondilitis anquilosante.

La comparación entre familiares y controles nos hace pensar en que estos son dos grupos muy diferentes destacando en los familiares un aumento en las frecuencias de los alelos HLA-B53, -B17, -DR3, -DR7 y C4A*3 que en los pacientes se mantienen con frecuencias semejantes al grupo control.

Al parecer la diferencia importante entre los grupos de pacientes y familiares radica en dos antígenos, que son, el HLA-DR5 presente en los pacientes y el HLA-DR7 presente en los familiares ya que en los demás alelos ambos grupos son muy semejantes.

Una vez realizado el análisis por alelos y al proceder con el análisis por pares de alelos, se encontró una combinación B35,DR5 representada más importantemente en los pacientes que en los sujetos control, esto nos hizo pensar en la existencia de haplotipos extendidos ó segmentos de dichos haplotipos que revistieran mayor importancia que los alelos por separado.

Al revisar los haplotipos de los pacientes encontramos la existencia de 5 haplotipos extendidos o segmentos, los cuales, incluían algunos de los antígenos reportados en la literatura como antígenos de susceptibilidad o de progresión de la enfermedad como son el HLA-DR5, -DR1, y -DR3.

De los antígenos cuyas frecuencias encontramos aumentadas en los pacientes con escleroderma, es importante señalar que el HLA-DR5 y el C4B*1 están incluidos en alguno de los 5 haplotipos extendidos anteriormente descritos, mientras que el FC31 no forma parte de ellos, lo cual, podría orientar a que esté complotipo represente una forma de susceptibilidad independiente a la que podrían dar los haplotipos descritos. El C4B*1 es un alelo que no se ha reportado asociado a escleroderma o a otra enfermedad autoinmune, sin embargo, el FC31 como ya se mencionó es un complotipo cuya frecuencia en nuestra población se encuentra aumentada básicamente en los pacientes con artritis reumatoide y con espondilitis anquilosante.

Cabe señalar que los haplotipos A2,B35,DR5,DQw3,DRw52,SC31 y A2,B5,DR4,DQw3,DRw53,SC31 marcados con el HLA-DR5 y -DR4 parecen tener un origen autóctono ya que se han encontrado en poblaciones indígenas mexicanas como los tzotziles.

El haplotipo A1,B17,DR7,DQw2,DRw53,SC61 marcado por el HLA-DR7 es un haplotipo extendido (frecuencia de 0.028) adquirido por mestizaje, el cual, se presenta principalmente en sujetos

de los países nórdicos y su frecuencia es muy alta en las islas del pacífico como las Filipinas, sin embargo, se cree que en esas islas su elevada frecuencia se debe al llamado efecto de fundador o deriva génica dado el elevado grado de consanguinidad existente.

El origen de los otros dos haplotipos (marcados por HLA-DR1 y -DR3) no se puede definir con certeza pero creemos que también pudieron adquirirse por mestizaje y es importante hacer notar que el primero de ellos (HLA-DR1) se encuentra básicamente en el cromosoma homólogo de los pacientes, lo cual, indica que este haplotipo requiere estar asociado con cualquiera de los otros haplotipos extendidos ya señalados para poder ejercer su efecto.

Es claro que la mayoría de los pacientes presentan uno u otro de los haplotipos extendidos o segmentos que incluyen principalmente a las moléculas clase II.

Cuando se consideró el subtipo clínico de la enfermedad, el HLA-DR5 fue más frecuente en la escleroderma difusa, y el HLA-B53 en el síndrome de CREST. Por otro lado, el FC31 y el C4B*1 fueron frecuentes en ambos grupos, con esto se puede pensar que los dos primeros antígenos (HLA-DR5 y -B53) sean marcadores del subtipo clínico de la enfermedad; el HLA-DR5 de la forma generalizada y el HLA-B53 del síndrome de CREST.

A pesar del bajo número de pacientes con escleroderma localizada y síndrome de Reynolds, es importante establecer que de los 5 pacientes que integran al primer grupo, 4 de ellos presentaron el HLA-DR5, mientras que el grupo de síndrome de Reynolds fue más heterogéneo destacando un aumento marginal en la frecuencia del C4B*2.

De todos los antígenos ya reportados en la literatura y que al parecer son importantes en la susceptibilidad a la enfermedad (tabla 3), nosotros, como ya se mencionó encontramos más frecuentemente en nuestros pacientes al HLA-DR5, sin embargo, nuestros cinco haplotipos extendidos incluyen a este mismo HLA-DR5 asociado en poblaciones caucásicas a la forma difusa de la enfermedad y a otros antígenos ya reportados como el HLA-DR1 asociado en poblaciones caucásicas con el síndrome de CREST y el HLA-DR3 asociado en esta misma población a gravedad de la enfermedad. Es importante hacer notar que si bien nosotros encontramos esos antígenos, ellos parecen

tener importancia cuando están incluidos en algún segmento o haplotipo extendido ya que aun el HLA-DR5 el cual, estuvo aumentado significativamente, cuando se incluye en el haplotipo con el HLA-B35 aumenta su valor significativo. Este antígeno HLA-B35 se reportó a su vez aumentado en forma aislada en 1982 en un grupo de 134 pacientes con escleroderma difusa (60) además de que en 1989 en un grupo de 40 pacientes rusos con escleroderma se asoció a la presencia de anticuerpos antinucleares (50% en pacientes vs 17% en controles, RR=4.8) (72).

El alelo HLA-DR7 es más importante cuando incluye a los otros alelos que integran el haplotipo B17,DR7,SC61. El HLA-DR3 cuando incluye el SC31 también cumple esta característica mientras que el HLA-DR1 se sale de este patrón y es más importante cuando está solo.

De los marcadores relevantes que han sido reportados en la literatura y los cuales estuvieron ausentes en nuestro trabajo destacan el HLA-DR8 (disminuido en nuestro estudio) y los alelos nulos en C4A y C4B. El HLA-DR8 es un antígeno de reacción cruzada con el DR5, el cual, dado el tipo de antisueros (principalmente de origen caucásico) que se usan es difícil distinguir en nuestra población. Por otro lado, la ausencia de alelos nulos en nuestro estudio se explica por las diferencias étnicas y cabe mencionar que en nuestra población los alelos nulos están confinados a los pacientes con lupus eritematoso generalizado (48).

Otros antígenos relevantes en la población inglesa son el B8,DR3 (52), los cuales, forman parte de un haplotipo extendido caucásico bien definido (A1,B8,DR3,SC01); este haplotipo además de ser en muchos estudios caucásicos asociado con autoinmunidad principalmente con LEG, se ha reportado que segrega como un rasgo mendeliano junto con la ruptura de cromosomas en pacientes también ingleses (76).

Cabe resaltar el hecho de que los alelos nulos en C4A se reportaron aumentados en la población inglesa, la cual, podría deberse a la presencia del anterior haplotipo extendido. Este haplotipo debido al reciente mestizaje en nuestra población no ha sido fijado y podría tener su contraparte en un haplotipo autóctono presente en los pacientes y marcado como A2,B5,DR4,SC31.

Los alelos nulos en C4B reportados en la población alemana parecen incluir un defecto en la cadena alfa (66), este punto tendría su contraparte en el complotipo SC61, en el cual, al parecer existe un defecto en el C4B haciendo a este deficiente en este alelo.

La escleroderma es una enfermedad autoinmune con características principalmente de fibrosis. Un punto importante sería el poder diferenciar cuales antígenos del SPH se asocian con una u otra de estas condiciones, sin embargo, en nuestro trabajo no podemos hacer dicha diferenciación ya que los antígenos y haplotipos que encontramos se han reportado asociados con ambas condiciones. Por un lado, Black (18) al estudiar la enfermedad por cloruro de vinilo encontró el HLA-DR5 asociado al proceso de fibrosis ya que en esta enfermedad no encontró presencia de autoanticuerpos y el HLA-DR3 lo asocio a la gravedad de la enfermedad. Por otro lado, en un estudio realizado en nuestro departamento en pacientes mestizos mexicanos con síndrome de antifosfolípido primario un haplotipo marcado por el HLA-DR5 estuvo al parecer asociado al fenómeno autoinmune como tal ya que en esta enfermedad no hay presencia de fibrosis y si de autoanticuerpos (49). Además de este antígeno, el HLA-DR3 se asocia a fibrosis de las mucosas en una enfermedad semejante a escleroderma producida por la ingestión de nueces de la India y por su parte, el HLA-DR4 se asocia también a fibrosis en sujetos que desarrollaron una enfermedad semejante a escleroderma al ingerir aceite contaminado en España (24). Como podemos observar, la mayoría de los estudios citados son en enfermedades semejantes a escleroderma, en las cuales, al parecer los antígenos si se asocian principalmente al proceso de fibrosis, sin embargo, en procesos autoinmunes, la asociación con antígenos del SPH es más heterogénea y por tanto, es difícil definir si realmente dichos antígenos solo se asocian al fenómeno autoinmune.

Desafortunadamente no existen trabajos de familias que nos permitan definir la asociación de estos haplotipos extendidos con alguna enfermedad. En nuestra población nosotros reportamos la presencia de 3 haplotipos extendidos en pacientes con síndrome de antifosfolípido primario, estos haplotipos incluían al HLA-DR5 y al HLA-DR4 pero incrustados en dos haplotipos diferentes a los

detectados en los pacientes con escleroderma. estos haplotipos fueron el A2,B21,DR5,DQw3,DRw52,SC31 y el A2,B35,DR4,DQw3,DRw53,SC31 (49).

Es importante hacer notar que la distribución de los haplotipos extendidos en los pacientes con escleroderma difusa y síndrome de CREST es diferente, en el primer grupo, los haplotipos extendidos se localizan en ambos cromosomas estableciendo un tipo de homocigocia para dichos haplotipos extendidos o segmentos. Por otro lado, en los pacientes con síndrome de CREST los haplotipos parecen estar localizados unicamente en uno de los cromosomas. Este punto implica que la homocigocia para estos haplotipos lleva a una forma grave de la enfermedad, mientras que el tener solo uno de estos haplotipos extendidos implica una forma limitada de dicha enfermedad.

La asociación de estos haplotipos extendidos con la enfermedad puede orientarse a dos formas de participación: la primera implica la existencia de un gen real de susceptibilidad incrustado en esos haplotipos y que segregue en desequilibrio de unión con dichos haplotipos. Este gen puede ser uno del sistema HLA no detectado o un gen no HLA. La segunda forma de participación implica la acción directa de estos haplotipos dada por el efecto que tienen estas moléculas (principalmente las clase II) en dos fenómenos muy importantes de la respuesta inmune, estos fenómenos son la selección del repertorio de la célula T y la presentación antigénica, ambos involucrados en el desarrollo de la tolerancia y por tanto de la autoinmunidad. Estas moléculas heterodiméricas clásicamente son de 5 tipos dependiendo de las cadenas que se combinen ($DP\alpha\beta$, $DQ\alpha\beta$, $DR\alpha\beta_1$, $DR\alpha\beta_3$, $DR\alpha\beta_4$), sin embargo, puede haber formación de moléculas híbridas por complementación cis (combinación de cadenas de diferente isotipo pero localizadas en el mismo cromosoma) o por complementación trans (combinación de cadenas de igual o diferente isotipo pero localizadas en diferentes cromosomas). Estas moléculas híbridas se han asociado a enfermedades autoinmunes como la enfermedad celiaca (26) y la diabetes mellitus insulino dependiente (68). La presencia de haplotipos extendidos en ambos cromosomas en los pacientes con escleroderma difusa implicaría la formación de estas moléculas híbridas por complementación trans para lo cual se combinaría una cadena de un haplotipo con una del otro haplotipo. Por su parte, en el síndrome de CREST la presencia de solo un haplotipo extendido

implicaría la formación de una molécula híbrida por complementación cis requiriéndose por tanto solo un haplotipo. Debido a lo anterior, la selección del repertorio de la célula T y la presentación antigénica que realizarían estas moléculas en los pacientes sería diferente a la realizada por una molécula no híbrida en sujetos sanos, implicando por tanto, alteraciones generales a nivel de la respuesta inmune.

Un punto que ayudaría a entender como es la patogénesis y la genética de la escleroderma es el estudio de los modelos animales, estos modelos han sido revizados y se sabe que existen tanto espontáneos como inducidos, cada modelo imita en parte ciertos aspectos de la enfermedad como son el inflamatorio, el inmunológico y el fibrótico. Los modelos más extensamente estudiados son el del ratón mutado TSK/+ y el del pollo UCD-L200 (20), sin embargo, estos modelos han sido estudiados ampliamente desde el punto de vista de sus alteraciones clínicas y lo que se requeriría en un futuro es ampliar estos estudios a los de genética formal para poder establecer de esta forma alguna asociación desde el punto de vista genético.

IX. CONCLUSIONES.

1.- Nuestros datos sugieren que en pacientes mexicanos la predisposición a Escleroderma asociada al sistema principal de histocompatibilidad es conferida más que por un alelo independiente, por un grupo de alelos que constituyen un haplotipo.

2.- En nuestro estudio detectamos 5 haplotipos posiblemente extendidos o segmentos de ellos que parecen conferir la susceptibilidad y a continuación se muestran en orden de frecuencia en los pacientes:

- a). A2,B35,DR5,DQw3,DRw52,SC31
- b). A2,B5 ,DR4,DQw3,DRw53,SC31
- c). , ,DR1,DQw1,DRw53,SC31
- d). A1,B17,DR7,DQw2,DRw53,SC61
- e). A1, ,DR3,DQw2,DRw52,SC31

La presencia de estos haplotipos extendidos o sus segmentos en el cromosoma homólogo parece ser fundamental para el desarrollo de susceptibilidad a la enfermedad.

3.- La presencia de haplotipos extendidos en el cromosoma homólogo en pacientes con escleroderma difusa y síndrome de CREST parece distinguir a estos dos subtipos clínicos. En la forma difusa los haplotipos extendidos o segmentos se presentan en ambos cromosomas, mientras que en la forma limitada (CREST) se localizan sólo en un cromosoma.

4.- Parecen existir marcadores que definen el subtipo clínico de la enfermedad como es el caso de HLA-DR5 que se presenta básicamente en la forma generalizada de la enfermedad y el HLA-B53 que esta conferido al síndrome de CREST.

5.- De las moléculas clase III el alelo C4B*1 y el complotipo FC3I se encontraron significativamente elevados en los pacientes indicando que podrían participar en la fisiopatogenia de la enfermedad.

6.- La asociación del HLA-DR5 y del C4B*2 en escleroderma localizada y síndrome de Reynolds respectivamente, fue evidente, pero el bajo número de pacientes hace difícil establecer conclusiones claras.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Alarcón-Segovia, D., Palacios, R. and Ibañez de Kasep (1981). Human postthymic precursor cells in healthy and disease. VII. Immunoregulatory circuits of the peripheral blood mononuclear cells from patients with progressive systemic sclerosis. *J Clin Lab Immunol* 5: 143-148.
- 2.- Alarcón-Segovia, D.(1985). Scleroderma. In: *The autoimmune diseases*. Academic Press Inc Rose N.R. and MacKay I.R (Eds.) Pags:119-143.
- 3.- Alcocer-Varela, J., Laffón, A., and Alarcón-Segovia, D. (1984). Differences in the production of and/or the response to interleukin-2 by T lymphocytes from patients with the various connective tissue diseases. *Rheumatol Int.* 4: 39-44.
- 4.- Alcocer-Varela, J., Martínez-Cordero, E., and Alarcón-Segovia, D. (1985). Spontaneous production of, and defective response to, interleukin-1 by peripheral blood mononuclear cells from patients with scleroderma. *Clin Exp Immunol.* 59: 666-672.
- 5.- Alper, CA. and Johnson, AM. (1969). Immunofixation electrophoresis: A technic the study of protein polymorphism. *Vox Sang* 57: 1-3.
- 6.- Alper, CA., Boenisch, T., and Watson, L. (1972). Genetic polymorphism in human glycine-Rich beta glycoprotein. *J Exp Med* 135: 68
- 7.- Alper, CA. (1976). Inherited structural polymorphism in human C2: Evidence for genetic linkage between C2 and Bf. *J Exp Med* 144: 1111-1115.

- 8.- Alper, CA., Awdeh, ZL., Raum, DD., Yunis, EJ. (1982). Hypothesis extended major histocompatibility complex haplotypes in man: role of alleles analogous to murine t mutants. *Clin Immunol Immunopathol.* 24: 276-285.
- 9.- Alper, CA., Raum, DD., Karp, S., Awdeh, ZL., Yunis, EJ. (1983). Serum complement "supergenes" of the major histocompatibility complex in man (complotypes). *Vox Sang* 45: 62-67.
- 10.- Awdeh, ZL., Alper, CA. (1980). Inherited structural polymorphism of the fourth component of human complement (C4). *Proc Natl Acad Sci. USA.* 77: 3576-3580.
- 11.- Awdeh, ZL., Raum, DD., Alper, CA. (1981). Major histocompatibility complex (MHC) linked complement haplotypes (complotypes) (Abstract). *Fed Proc.* 40: 1066.
- 12.- Barnett, AJ., Tait, BD., Barnett, MA., and Toh, BH. (1989). T lymphocyte subset abnormalities and HLA antigens in scleroderma (systemic sclerosis). *Clin Exp Immunol.* 76: 24-29.
- 13.- Basset, ML., Halliday, JW., Powell, LW. (1981). HLA typing in idiopathic hemochromatosis distinction between homozygotes and heterozygotes with biochemical expression. *Hepatology* 1: 120-126.
- 14.- Bidwell, J. (1988). DNA-RFLP analysis and genotyping of HLA-DR and DQ antigens. *Immunol Today* 9: 18-22.
- 15.- Birnbaum, NS., Rodnan, GP., Rabin, BS., and Bassion, S. (1977). Histocompatibility antigens in progressive systemic sclerosis (scleroderma). *J Rheumatol* 4: 425-428.

- 16.- Bjorkman, PJ., Saper, MA., Samraoui, B., et al. (1987a). Structure of the human class I histocompatibility antigens, HLA-A2. *Nature*. 329: 506-512.
- 17.- Bjorkman, PJ., Saper, MA., Samraoui, B., et al. (1987b). The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature*. 329: 512-518.
- 18.- Black, CM., Walker, AE., Catoggio, LJ., Welsh, KI., Bernstein, RM., and McGregor, AR. (1983). Genetic susceptibility to scleroderma-like syndrome induced by vinyl chloride. *The Lancet* 1(8314-5): 53-55.
- 19.- Black, G., Strominger, JL. (1988). Molecular organization of the DQ subregion (D0-DX-DV-DQ) of the human MHC and its evolutionary implications. *J Immunol*. 141: 1734-1737.
- 20.- Bocchieri, MH., and Jimenez, SA. (1990). Animal models of fibrosis. *Rheumatic Disease Clinics of North America*. 16: 153-167.
- 21.- Bodmer, JG., Kennedy, LJ., Lindsay, J., Wasik, AM. (1987). Applications of serology and the ethnic distribution of three locus HLA haplotypes. *Brit Med Bull*. 43: 94-121.
- 22.- Bottazzo, GF., Pujol-Borrell, R., Hanafusa, T., Feldmann, M. (1983). Role of aberrant HLA-DR expression and antigen presentation in induction of endocrine autoimmunity. *Lancet*. 12: (8359): 1115-1119.
- 23.- Briggs, DC., Welsh, K., Pereira, S., and Black, CM. (1986). A strong association between null alleles at the C4A locus in the major histocompatibility complex and systemic sclerosis. *Arth Rheum*. 29: 1274-1277.

- 24.- Briggs, DC., Black, C., and Welsh, K. (1990). Genetic factors in scleroderma. *Rheumatic Disease Clinics of North America*. 16: 31-51.
- 25.-Brown, JH., Jardetzky, T., Saper, MA. et al. (1988). A hypothetical model of the foreign antigen binding site of the class II histocompatibility molecules. *Nature*. 332: 845-850.
- 26.- Bugawan, TL., Angeline, G., Larrick, J., et al. (1989). A combination of a particular HLA-DPB allele and an HLA-DQ heterodimer confers susceptibility to coeliac disease. *Nature* 339: 470-473.
- 27.- Campbell, RD. (1987). The molecular genetics and polymorphism of C2 and factor B. *Brit Med Bull* 43: 37-49.
- 28.- Carroll, MC., Campbell, RD., Porter, RR. (1985). Mapping of steroid 21-hydroxylase genes adjacent to complement component C4 genes in HLA, the major histocompatibility complex in man. *Proc Natl Acad Sci. USA*. 82: 521-525.
- 29.- Carroll, MC., and Alper, CA. (1987). Polymorphism and molecular genetic of human C4. *Brit Med Bull* 43: 37-49.
- 30.- Catoggio LJ. et al. (1983). Serological markers in progressive systemic sclerosis: clinical correlations. *Ann Rheum Dis*. 42: 23-27.
- 31.- Cavelli, S., Bodmer, F. (1980). The genetic of human population. A.P.II. Segregation and linkage analysis in human pedigrees and the estimation of gene frequencies. pp: 851.

- 32.- Clements, PJ., Opelz, G., Terazaki, PL., Mickey, MR., and Furst, D. (1978). Association of HLA antigens A9 with progressive systemic sclerosis (scleroderma). *Tissue Antigens* 11: 357-361.
- 33.- Cresswell, P. (1987). Regulation of HLA class I and class II antigens expression. *Brit Med Bull* 43: 66-80.
- 34.- Crouzet, J., Marbach, MC., Camus, JP., Godean, P., et al. (1975). Recherche d'une association entre antigenes HL-A et sclerodermie systemique. *M Presse Med* 4: 2489-2492.
- 35.- Duncley, H., Jazwinska, EC., Gatenby, PA and Serjeantson, SW. (1989). DNA-DR typing shows HLA-DRw11 RFLPs are increased in frequency in both progressive systemic sclerosis and CREST variants of scleroderma. *Tissue Antigens* 33: 418-420.
- 36.- Dunham, I., Sargent, CA., Trowsdale, J., Campbell, RD. (1987). Molecular mapping of the human major histocompatibility complex by pulsed-field gel electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 84: 7237-7241.
- 37.- Dupont, B. (1987). *Immunology of HLA nomenclature* committe/Dupont, B (Ed). Springerer Verlag.
- 38.- Emerit, I., Housset, R., and Feingold, J. (1976). Chromosomal breakage and scleroderma: studies in family members. *J Lab Clin Med*. 88: 81-86.
- 39.- Fennell, RH., Rodnan, GP., and Vazquez, JJ. (1962). Variability of tissue-localized properties of serum from patients with different disease states. *Lab Invest* 11: 24-31.

- 40.- Geczy, AF., Alexander, K., Bashir, HY., Edmonds, JP. (1980). Characterization of a factor(s) present in Klebsiella culture filtrates that specifically modifies an HLA-27 associated cell-surface component. *J Exp Med* 1:152(2pt.2):331-340.
- 41.- Germain, BF., Espinoza, LR., Bergen, LL., Vagesh, M., and Vasey, FB. (1981). Increased prevalence of DRw3 in the CREST syndrome. *Arth Rheum* 24: 857-859.
- 42.- Germain, RN. (1987). The ins and outs of antigen processing and presentation. *Nature* 322: 687
- 43.- Giordano, M., Magri, D., Valentini, G., Tirri, G and De Biasi, R. (1979). HLA-SD antigens in progressive systemic sclerosis. *Arch Dermatol Res* 266: 213-216.
- 44.- Gladman, DD., Keystone, EC., Baron, M., Lee, P., Cana, D and Mervert, H. (1981). Increased frequency of HLA-DR5 in scleroderma. *Arth Rheum* 24: 854-856.
- 45.- Gonzalez-Amaro, R., Alarcón-Segovia, D., Alcocer Varela, J, et al. (enviado a publicación). Mononuclear cell-fibroblast interactions in scleroderma.
- 46.- Gorodezky, C., Najera, R., Rangel, BE., Castro, LE., Flores, J., Velazquez, G., Granados, J., Sotelo, J. (1986). Immunogenetic profile of multiple sclerosis in mexican human. *Human Immunol* 16: 364-372.
- 47.- Gorski, J., and Mach, B. (1986). Polymorphism of human Ia antigens: gene between two DR loci results in a new HLA-D/DR specificity. *Nature* 322: 67-68.

- 48.- Granados, J., Olivares, I., Melin, H., Andrade, F., and Alarcón-Segovia, D. (1987). Further evidence of the role of complement genotypes in the susceptibility to systemic lupus erithematosus obtained from Mexican family studies (abstract). *Arth Rheum.* 30 (suppl 4): S21.
- 49.- Granados, J., Vargas-Alarcón, G., Sanchez, J. and Alarcón-Segovia, D. (1991). Predisposition to the primary antiphospholipid syndrome in mexicans is encoded by extended haplotypes of the major histocompatibility complex. Enviado a publicación.
- 50.- Hughes, P., et al (1976). Thymus-dependent (t) lymphocytes deficiency in progressive systemic sclerosis. *Br J Dermatol.* 95: 469-473.
- 51.- Hughes, P., Gelsthorpe, K., Doughty, RW., Rowell, NR., Rosenthal, FD and Sneddon, B. (1978). The association of HLA-B8 with visceral disease in systemic sclerosis. *Clin Exp Immunol.* 31: 351-356.
- 52.- Kallenberg, CGM., Van Der Voort-Beelen, JM., D'Amato, J., and The, TH. (1981). Increased frequency of B8/DR3 in scleroderma and association of the haplotype with impaired cellular immune response. *Clin Exp Immunol.* 43: 478-485.
- 53.- Klein, J. (1987). Origin of the major histocompatibility complex polymorphism the trans-species hypothesis. *Hum Immunol.* 19: 155-162.
- 54.- Koller, BH., Geraghty, DE., Shimizu, Y., De Mars, R., Orr, HT. (1988). HLA-E: A novel HLA class I gene expressed in resting T lymphocytes. *J Immunol.* 141: 897-904.

- 55.- Koller, Bh., Geraghty, DE., De Mars, R., Orr, HT, et al. (1989). Chromosomal organization of the human major histocompatibility complex class I gene family. *J Exp Med.* 169: 469-480.
- 56.- Krakauer, RS., Sundeen, J., Saudet, DN., et al. ((1981). Abnormalities of immunoregulation in progressive systemic sclerosis, evidence for excess helper cell function and altered B cell function. *Arch Dermatol.* 117: 80
- 57.- Lawrence, SK., Smidh, CL., Srivastava, R., Cantor, CR., Weissman, SM. (1987). Megabase scale mapping of the HLA gene complex by pulsed field gel electrophoresis. *Science* 235: 1387-1380.
- 58.- Livingston, JZ., Scott, TE., Wigley, FM., Anhalt, GJ., Bias, WB., McLean, RH., and Hochberg, MC. (1987). Systemic sclerosis (scleroderma): Clinical, genetic, and serologic subsets. *J Rheumatol.* 14: 512-518.
- 59.- Luderschmidt, C., Konig, G., Leisner, B., Scholz, S., and Albert, EE. (1987). Circumscribed scleroderma: internal manifestation and significant correlation to HLA-DR1 and DR5. *Hautarzt* 36: 516-521.
- 60.- Lynch, CJ., Singh, G., Whiteside, TL., Rodnan, GP., Medsger, TA and Rabin, BS. (1982). Histocompatibility antigens in progressive systemic sclerosis (PSS;Scleroderma). *J Clin Immunol.* 2: 314-318.
- 61.- Maddison, PJ., Skinner, RP., Pereira, RS., Black, CM., et al. (1986). Antinuclear antibodies in the relatives and spouses of patients with systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 45: 793-799-

- 62.- Majsky, A., Kobikova, M., and Stava, Z. (1979). HLA and scleroderma. *Tissue Antigens* 14: 359-360.
- 63.- McFarlane, IG. (1984). Autoimmunity in liver disease. *Clin Sci.* 67: 569-578.
- 64.- McGregor, AR., Watson, A., Yunis, E., Pandey, JP., Takehara, K., Tidwell, JT and et al. (1988). Familial clustering of scleroderma spectrum disease. *Am J Med.* 84: 1023-1032.
- 65.- Mc Intire, KR., and Seidman, JG. (1984). Nucleotide sequence of mutant I-AB-bm 12 gene is evidence for genetic exchange between mouse immune response genes. *Nature* 308: 551-553.
- 66.- Mollenhauer, E., Schmidt, R., Heinrichs, M., and Rittner, C. (1984). Scleroderma: Possible significance of silent alleles at the C4B locus. *Arth Rheum* 27: 711-712.
- 67.- Morimoto, C., Halfer, DA., Weiner, HL., Letvin, NL., Hogan, M., Daley M., Soholossman, SF. (1987). Selective loss of the suppressor inducer T cell subset in progressive multiple sclerosis. Analysis with anti-2H4 monoclonal antibody. *N Eng J Med.* 316: 67-72.
- 68.- Nepom, BS., Schwarz, D., Palmer, JP., and Nepom, GT. (1987). Transcomplementation of HLA genes in IDDM. HLA-DQ alpha- and beta- chains produce hybrid molecules in DR3/4 heterozygotes. *Diabetes* 36: 114-117.
- 69.- Niks, M., Rovensky, J., Nyulassy, S., Buc, M., and Zitnan, D. (1982). Lack of association of HLA-DR antigens with progressive systemic sclerosis (scleroderma). *Tissue Antigens.* 19: 238-239.

- 70.- Nishikai, M., Okano, Y., Yamashita, H., et al. (1984). Characterization of centromere (kinetochore) antigens reactive with sera of patients with a scleroderma variant (CREST syndrome). *Ann Rheum Dis* 43: 819-824.
- 71.- Palmer, RG., Pereira, RS., Dore, CJ., and Denman, AM. (1986). Sister chromatide exchange frequencies in patients with scleroderma and their relatives. *Ann Rheum Dis.* 45: 409-411.
- 72.- Pevnitskii, LA., Gusera, NG., Sibiriakova, LG., et al. (1989). Analysis of the distribution of class I HLA-antigens in patients with systemic scleroderma with regard to features of the clinical course of the disease and therapy with D-penicilamina. *Genetika.* 25: 1101-1107.
- 73.- Pan, SF., Rodnan, GP., Deutsch, M., and Wald, N. (1975). Chromosomal abnormalities in progressive systemic sclerosis (scleroderma) with consideration of radiation effects. *J Lab Clin Med.* 86: 300-308.
- 74.- Postlethwarte, AE. (1990). Early immune events in scleroderma. *Rheumatic Disease Clinics of North America.* 16: 125-139.
- 75.- Rabin, BS., Rodnan, GP., Bassion, S., and Gill, TJ. (1975). HLA antigens in progressive systemic sclerosis (scleroderma). *Arth Rheum.* 18: 381-382.
- 76.- Rittner, G., Schwanitz, G., Baur, MP., Black, CM., Welsh, KI., Kuhn, P and Rittner, C. (1988). Family studies in scleroderma (systemic sclerosis) demonstrating an HLA-linked increased chromosomal breakage rate in cultured lymphocytes. *Hum Genet* 81: 64-70.

- 77.- Rodnan, GP., Joblansta, S., Medsger, TA, Jr. (1979). Classification and nomenclature of progressive systemic sclerosis (scleroderma). *Clin Rheum Dis*. 5: 1
- 78.- Rothfield, NF., and Rodnan, GP.(1968). Serum antinuclear antibodies in progressive systemic sclerosis (scleroderma). *Arth Rheum*. 11: 607-617.
- 79.- Sargent, CA., Dunham, I., Trowsdale, J., Campbell, RD. (1989). Human mayor histocompatibility complex contains genes for the mayor heat shock protein HSP70. *Prc Natl Acad Sci USA* 86: 1968-70.
- 80.- Schwimmbeck, PL., and Yudit Oldstone, MB. (1987). Autoantibodies to HLA-B27 in the sera of HLA-B27 patients with ankylosing spondylitis and Reiter's syndrome molecular mimicry with klebsiella pneumoniae as potential mechanism of autoimmune disease. *J Exp Med*. 166: 173-181.
- 81.- Sherer, GK., Jackson, BB., and LeRoy, EC. (1981). Chromosome breakage and sister chromatid exchange frequencies in scleroderma. *Arth Rheum*. 24: 1409-1413.
- 82.- Soppi, E., Lehtonen, A., and Toivanen, A. (1982). Familial progressive systemic sclerosis (scleroderma): immunological analysis of two patients and six siblings from a single kindred. *Clin Exp Immunol*. 50: 275-282.
- 83.- Spies, T., Blanck, G., Bresnahan, M., Sands, J., Strominger, JL. (1989). A new cluster of genes within the human major histocompatibility complex. *Science* 243: 214-217.
- 84.- Steen, VD., Powell, DL., and Medsger, TA. (1988). Clinical correlations and prognosis based on serum autoantibodies in patients with systemic sclerosis. *Arth Rheum* 31: 196-203.

- 85.- Steen, VD., Medsger, TA. (1990). Epidemiology and natural history of systemic sclerosis. Rheumatic Disease Clinics of North America. 16: 1-11.
- 86.- Strachan, T. (1987). Molecular genetic and polymorphism of class I HLA antigens. Brit Med Bull 43: 1-14.
- 87.- Strominger, JL. (1987). Structure of class I and class II HLA antigens. Brit Med Bull 43: 81-93.
- 88.- Takehara, K., Moroi, Y. and Ishibashi, Y. (1985). Antinuclear antibodies in the relatives of patients with systemic sclerosis, Br J Dermatol 112: 23-33.
- 89.- Tiwari, JL., and Terasaki, PI. (1985). HLA and disease associations. New York Springer Verlag.
- 90.- Tiwari, JL., and Terasaki, PI. (1987). HLA and diseases. New York, Springer Verlag.
- 91.- Trowsdale, J. (1987). Genetic and polymorphism class II antigens. Brit Med Bull 43: 15-36.
- 92.- Tuffanelli, DL. (1969). Scleroderma, immunological and genetic disease in three families. Dermatologica 138: 93-104.
- 93.- Weiner, ES., Earnshaw, WC, et al. (1983). Clinical association of anticentromere antibodies and antibodies to topoisomerase I: a study of 355 patients. Arth Rheum. 31: 378-385.
- 94.- White, PC., Grossberger, D., Onufer, BJ., Chaplin, DD., et al. (1985). Two genes encoding steroid 21-hydroxylase are located near the genes encoding the fourth component of complement in man. Proc Natl Acad Sci. USA. 82: 1089-1093.

- 95.- Whiteside, TL., Medsger, TA., and Rodnan, GP. (1983). HLA-DR antigens in progressive systemic sclerosis (scleroderma). *J Rheumatol.* 10:128-131.
- 96.- Yunis, EJ. (1988). MHC haplotypes in biology and medicine. *Am J Clin Pathol.* 89: 268-280.
- 97.- Zavala, C. (1980). Contribución de los factores genéticos y ambientales en las malformaciones congénitas. *Tem Select Ped Clin* 2: 185