

## Tesis de Posgrado

# Polimorfismo a nivel genómico de los antígenos de histocompatibilidad de clase II en individuos normales y enfermos celíacos

Herrera Piñero, Mariana

1991

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Herrera Piñero, Mariana. (1991). Polimorfismo a nivel genómico de los antígenos de histocompatibilidad de clase II en individuos normales y enfermos celíacos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2436\\_HerreraPinero.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2436_HerreraPinero.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Herrera Piñero, Mariana. "Polimorfismo a nivel genómico de los antígenos de histocompatibilidad de clase II en individuos normales y enfermos celíacos". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1991.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2436\\_HerreraPinero.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2436_HerreraPinero.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

TRABAJO DE TESIS DOCTORAL

-----

TITULO: "POLIMORFISMO A NIVEL GENOMICO DE LOS ANTIGENOS DE HISTOCOMPATIBILIDAD DE CLASE II EN INDIVIDUOS NORMALES Y ENFERMOS CELIACOS"

TESISTA: MARIANA HERRERA PINERO

DIRECTOR: DR. M. LEONARDO SATZ

LUGAR DE TRABAJO: HOSPITAL DE CLINICAS "JOSE DE SAN MARTIN"

Tesis.  
2436  
y 2.

## AGRADECIMIENTOS

-----

Al Dr. Leonardo Satz, por su valiosa dirección en mi trabajo de tesis.

A mi gran amiga y compañera de trabajo Lilien Chertkoff, por el apoyo y la compañía mutua que nos brindamos.

A todos mis compañeros de la Sala 4, por la buena onda a lo largo de todos estos años.

A las Licenciadas Alicia Mota y Ethel Palavecino, por la tipificación serológica de los pacientes celíacos y controles.

A la Dra. Susana de Rosa del servicio de Gastroenterología del Hospital Nacional de Pediatría "Dr. J.P. Garrahan", por proveernos de los pacientes celíacos.

Al Dr. Leonardo Fainboim, por sus aportes críticos a este trabajo.

A los Laboratorios Boehringer, por su aporte para la realización material de esta tesis.

A los laboratorios Biosidus, por proveerme del material necesario para muchos de mis experimentos.

A mi amiga Alejandrita, por su buena onda y consejos de todos estos años.

A mis amigos Fernando Bravo Almonacid y Ariel Wilner, por su valiosa asesoría técnica e intercambio de materiales.

A mi amiga Vivi Bernath, por el empuje que me dió y por su activa participación en la transmisión en los chismes científicos, fundamentales para culminar con éxito mi labor de todos estos años.

A mis padres,  
a Añé,  
a Daniel.

# INDICE

## INTRODUCCION

1-Estructura y función del Complejo Mayor de Histocompatibilidad	1
1.1-Función de las moléculas de histocompatibilidad	2
1.2-Estructura de las moléculas de clase II	3
1.3-Distribución de las moléculas de clase II	4
1.4-Productos HLA de clase II humanos HLA-DR, -DQ y -DP	6
1.5-Organización genómica de los genes de clase II	6
1.6-Mecanismos moleculares de la regulación de la expresión de los genes de clase II	8
1.7-Polimorfismo de las moléculas de clase II	8
1.8-Origen del polimorfismo de los genes de clase II	12
1.9-Tipificación del sistema HLA	17
1.10-HLA y genética poblacional	19
1.11-Asociación entre HLA y enfermedad	20
1.12-Enfermedades autoinmunes	22
2-Enfermedad celíaca	24
2.1-Definición y características	24
2.2-Diagnóstico de la enfermedad celíaca	25
2.3-Asociación entre HLA y enfermedad celíaca	26
2.4-Expresión de los antígenos de clase II en el intestino delgado de enfermos celíacos	27
OBJETIVOS	29

## MATERIALES Y METODOS

1-Tipificación serológica de los alelos HLA	31
2-Extracción de DNA a partir de linfocitos de sangre periférica	31
3-Southern Blot	32
4-Hibridización con sondas radioactivas	33
5-Purificación de RNA a partir de linfocitos de sangre periférica	36
6-Síntesis de cDNA	37
7-Amplificación enzimática del DNA (PCR)	37
8-Tipificación del DNA amplificado por hibridización con oligonucleótidos específicos	40
8.1-Siembra del DNA amplificado en soportes sólidos ("dot blot")	40
8.2-Marcación de los oligonucleótidos en 5' con 32P	40
8.3-Hibridización y lavados	41
9-Purificación y subclonado del DNA amplificado por PCR	42
9.1-Purificación del producto de amplificación por PCR	42
9.2-Ligado del DNA al vector	43
9.3-Preparación y transformación de bacterias competentes con el vector recombinante	43
9.4-Rastreo e identificación de las colonias portadoras del inserto	45
10-Extracción de los plásmidos recombinantes.	45

11-Determinación de la secuencia nucleotídica del DNA amplificado	46
11.1-Annealing del primer al templado	46
11.2-Marcación	46
11.3-Terminación	46
11.4-Gel de poliacrilamida	46
11.5-Electroforesis	47

## RESULTADOS

1-Estudio del polimorfismo genómico de las moléculas de histocompatibilidad de clase II	48
1.1-Análisis de líneas celulares	50
1.2-Patrones RFLP generados por la sonda DQA	58
1.3-Análisis del sistema DQB/BglII	62
1.4-Análisis del sistema DPB/BglII	62
1.5-Análisis del sistema DRB/BglII	62
1.6-Análisis del sistema DOB/BglII	63
1.7-Comentarios	63
1.8-Conclusiones Generales	64
2-Estudios a nivel serológico de la enfermedad celíaca en la Argentina	67
3-Characterización molecular de los alelos HLA asociados a la enfermedad celíaca en la Argentina	72
3.1-Análisis de los RFLPs asociados a los genes HLA-DP en pacientes celíacos y normales de origen latinoamericano	72
3.2-Bases moleculares de la asociación del alelo DR5	79
3.3-Characterización molecular de los alelos DQA y DQB presentes en enfermos celíacos argentinos	82
3.4-Búsqueda de RFLPs específicos de enfermos celíacos portadores del fenotipo DR5/7	88

3.5-Clonado y secuenciación de los genes de histocompatibilidad de clase II de 2 enfermos celíacos portadores del haplotipo DR5/7	93
3.6-Estudios de las variantes HLA-DQ potencialmente permisivas a la enfermedad celíaca	96
3.7-Characterización molecular de los genes de clase II en pacientes que no portan el dímero de susceptibilidad DQA1 0501/ DQB1 0201	100
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>108</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>112</b>

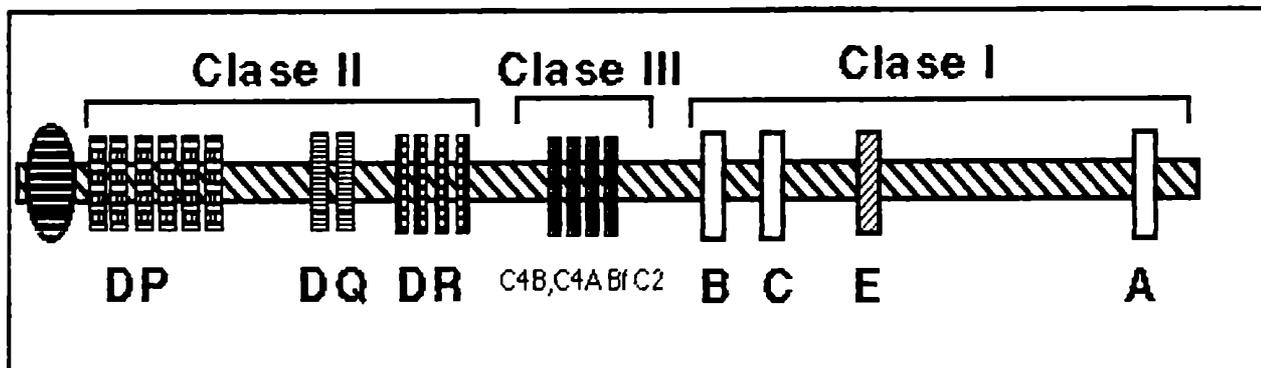
# INTRODUCCION

## ESTRUCTURA Y FUNCION DEL COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD.

El complejo mayor de histocompatibilidad humano (HLA) codifica para varias glicoproteínas de la superficie celular y para algunas de las proteínas componentes del sistema complemento, las cuales median una variada gama de funciones inmunológicas. En particular, la función esencial de las moléculas de histocompatibilidad es la presentación de los péptidos antigénicos al repertorio de linfocitos T (Trowsdale 1985, Korman 1985).

El sistema HLA se halla localizado en el brazo corto del cromosoma 6 (Kaufman 1984) (Fig.1). Las glicoproteínas de superficie codificadas por el mismo han sido divididas en dos clases de acuerdo a su estructura, distribución tisular y función (Bodmer 1984).

Figura 1: Mapa del brazo corto del Cromosoma 6 Humano. Región HLA.



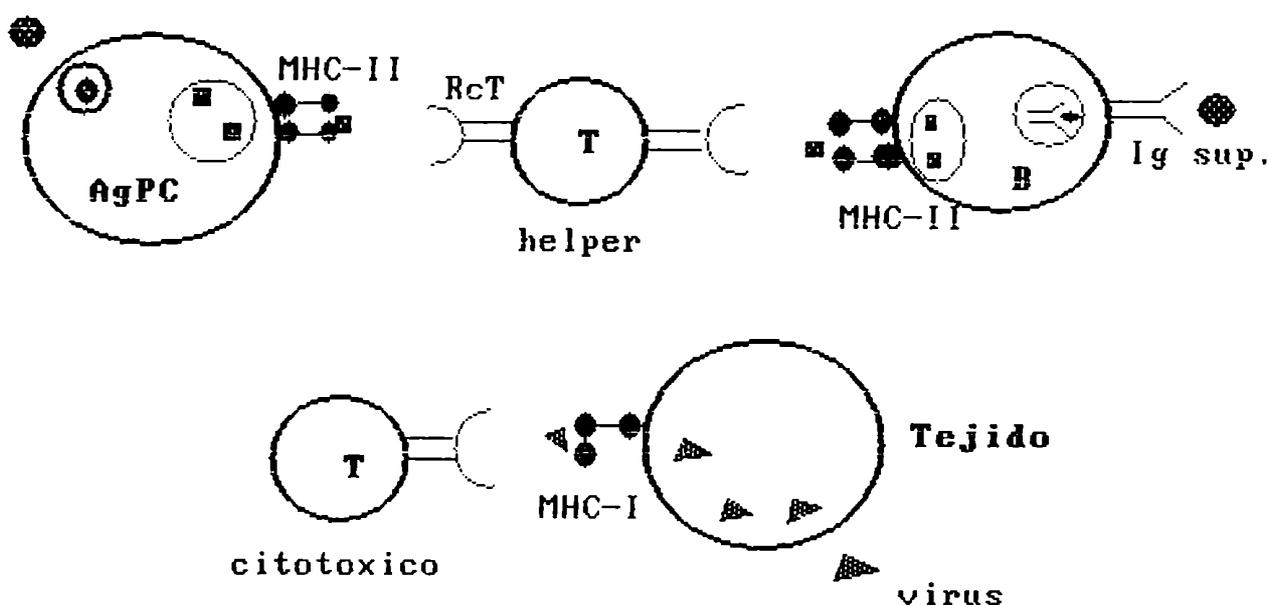
Las moléculas de clase I (denominadas anteriormente antígenos clásicos de trasplante), se encuentran codificadas en los loci HLA-A, -B, -C y se expresan en la superficie de todas las células nucleadas, en asociación no covalente con una cadena de  $\beta$ -2 microglobulina (la cual no se halla codificada dentro del sistema HLA). Estas moléculas de clase I presentan péptidos antigénicos a los linfocitos T citotóxicos CD8. Por el contrario, las moléculas de clase II, son productos de los genes HLA-DR, HLA-DQ y HLA-DP (comprendidos en la región D) y presentan una distribución mucho más restringida, primariamente asociadas a la

superficie de linfocitos B, macrófagos y linfocitos T activados, y participan en la respuesta inmunológica durante el reconocimiento del antígeno por los linfocitos T CD4 (Kaufman 1984). Algunos de los genes que codifican para productos del sistema complemento, se encuentran localizados entre los genes de clase II y de clase I y sus productos se denominan moléculas de clase III.

**Función de las moléculas de histocompatibilidad:**

La función biológica de las moléculas de histocompatibilidad es la de presentar péptidos antigénicos para la activación de los linfocitos T (Fig.2).

**Figura 2:** Interacción entre las células del sistema inmune ante la presencia de un antígeno extraño y rol de los productos del sistema HLA. AgPc: Célula presentadora de un antígeno en el contexto del MHC de clase II. T4: Linfocito T "helper" (regulador de la respuesta por interacción con las otras células del sistema inmune). B: Linfocito B. T8: Linfocito T citotóxico responsable de la eliminación de antígenos asociados a superficies celulares que además expresan antígenos HLA de clase I.



Es a través del receptor de los linfocitos T que el antígeno es reconocido en el contexto de una molécula de clase I o de clase II para generar una respuesta inmunológica. Los linfocitos T capaces de reconocer al antígeno en el contexto de una molécula de clase II, presentan además moléculas de diferenciación CD4 en su superficie y pertenecen en su mayoría a la subpoblación inductora o "helper". Los linfocitos que reconocen al antígeno en el contexto de una molécula de clase I, presentan moléculas de diferenciación CD8 y pertenecen a la subpoblación supresora/citotóxica. Durante la etapa de reconocimiento antigénico, las moléculas accesorias CD4 y CD8 se unen a determinantes no polimórficos en las moléculas de histocompatibilidad, de manera tal que confieren estabilidad entre la célula presentadora y la respondedora. Estas moléculas accesorias también juegan un rol importante en la transducción de señales al interior del linfocito T.

Una vez activados, los linfocitos T CD4 producen citoquinas que permiten la activación de linfocitos T CD8, de linfocitos B para su diferenciación en plasmocitos, y de macrófagos capaces de generar las respuestas inflamatorias (Balkwill 1989, Gromo 1987).

#### **Estructura de las moléculas de clase II:**

Son glicoproteínas constituidas por un heterodímero, con una cadena  $\alpha$  de 229 aminoácidos (32-34 kdal) y una cadena  $\beta$  de 237 aminoácidos (28-29 kdal), unidas no covalentemente (Fig.3) (Kvist 1982). Cada cadena posee dos dominios globulares externos, con puentes disulfuro intracatenarios (entre cisteínas separadas por aproximadamente 65 residuos) en ambos dominios de la cadena  $\beta$  y en el dominio próximal de membrana de la cadena  $\alpha$ . El dominio distal a la membrana de las cadenas  $\beta$  posee 94 residuos, mientras que el dominio proximal 84. La molécula de clase II continúa luego con el llamado péptido de conexión de 10 residuos hidrofílicos, hacia el tramo transmembránico de 21 residuos hidrofóbicos, para finalizar en el interior de la célula con una cola citoplasmática de 8-18 aminoácidos (según el producto) del extremo carboxi-terminal. Las cadenas  $\alpha$  poseen una organización similar.

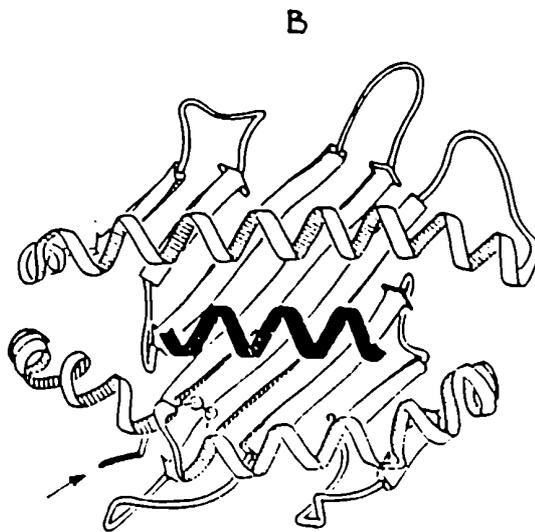
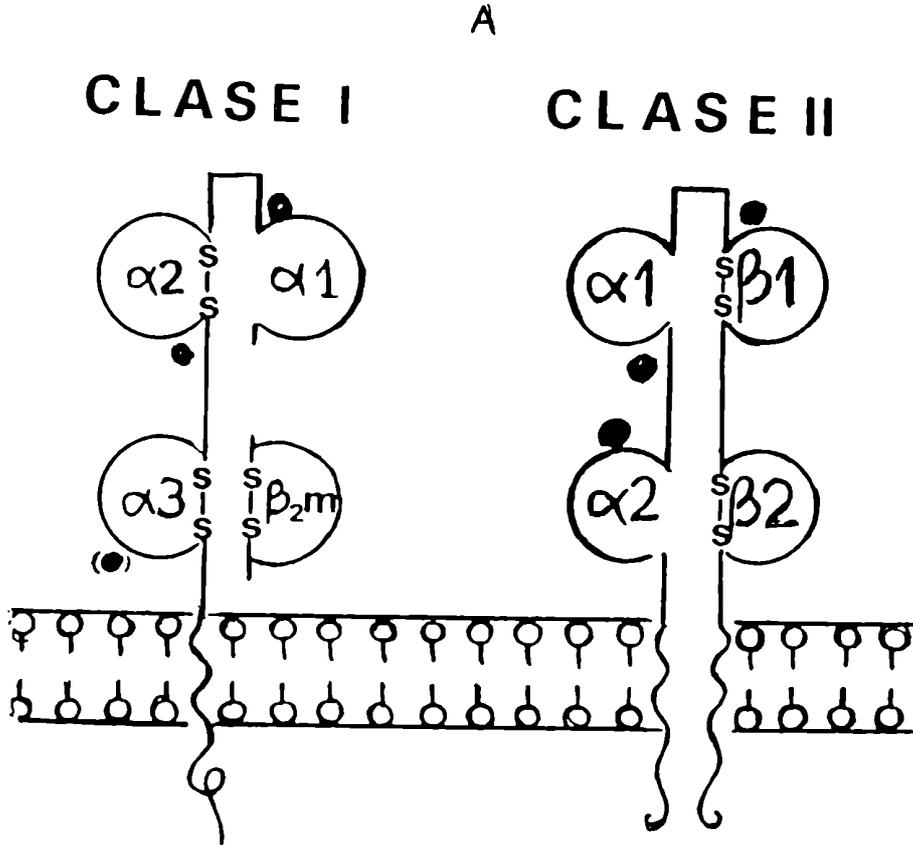
No se conoce aún la estructura cristalográfica de las moléculas de clase II. Los modelos generados por computación predicen que los dominios más distales  $\alpha 1$  y  $\beta 1$  adoptarían en el espacio una estructura

como de fosa o de bolsillo, similar a la adoptada por los dominios  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  en las moléculas de clase I (Bjorkman 1987, Brown 1988). En la estructura de clase I los dominios  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  se combinan para ensamblar una estructura tipo de "fosa acanalada", localizada en la porción más externa de la molécula, la cual constituiría el sitio de unión a péptidos (Fig.3). Uno de los surcos está definido por una estructura de  $\alpha$  hélice del dominio  $\alpha 1$  (entre los aminoácidos 50 y 84) y el otro está definido por una estructura de  $\alpha$  hélice del dominio  $\alpha 2$  (entre los residuos 138 y 180). La base de la fosa está constituida por 8 láminas  $\beta$  plegadas, cuatro aportadas por cada dominio. Las dimensiones de esta estructura (25 A de largo, 10 A de ancho y 11 A de profundidad) brinda sitio suficiente para acomodar péptidos de 10 a 20 aminoácidos, en estructura de  $\alpha$  hélices o en otra conformación más extendida. Toda esta conformación estaría apoyada sobre un "armazón" determinado por los dominios más próximos a la membrana  $\alpha 3$  y  $\beta 2$  microglobulina. En el caso de las moléculas de clase II este bolsillo estaría formado por el dominio  $\alpha 1$  y  $\beta 1$  amino-terminal. En el fondo del saco estas cadenas adquirirían una conformación de lámina  $\beta$  plegada, mientras que las paredes del mismo presentarían una conformación de  $\alpha$  hélice (Fig.3). Los residuos conservados miran hacia afuera del sitio de unión antigénico y los residuos polimórficos miran hacia adentro del mismo. La zona de unión antigénica se encuentra dentro del bolsillo tanto en la zona de  $\alpha$  hélice como de lámina  $\beta$  plegada de los dominios  $\alpha 1$  y  $\beta 1$ . En esta misma zona o hacia arriba del bolsillo se encuentran los residuos responsables de la interacción con el receptor T.

#### Distribución de las moléculas de clase II:

Los primeros estudios de expresión de las moléculas de clase II mostraron que las mismas se hallaban primariamente asociadas a linfocitos B y macrófagos (Winchester 1980). El mejoramiento de técnicas serológicas usando anticuerpos monoclonales ha permitido realizar un análisis más exhaustivo de la distribución tisular de estos antígenos (Radka 1986). Se expresan constitutivamente en la superficie de linfocitos B, monocitos, precursores eritroides, células de Langerhans, células de Kupfer y linfocitos T activados. Su expresión puede inducirse por la acción de interferón gama en linfocitos T, células natural

**Figura 3:** Estructura de las moléculas de histocompatibilidad. (A) Dominios de las moléculas de clase I y de clase II. (B) Sitio de presentación de péptidos en una molécula de clase I, según la interpretación de los estudios cristalográficos, tal como sería visto por el receptor T. La flecha indica el extremo amino terminal. La porción alfa hélice superior y las cuatro láminas beta plegadas de la izquierda provienen de  $\alpha 1$ ; las otras cuatro láminas beta y el alfa hélice inferior corresponden al dominio  $\alpha 2$ . La hélice en el centro representa un péptido antigénico de 15 residuos.



killer, células del endotelio vascular, del epitelio tímico, keratinocitos, melanocitos, astrocitos y fibroblastos (Houghton 1984). También se los halla en la superficie de células tumorales, en leucemias, melanomas, linfomas, carcinomas renal, de pulmón, de ovario, de colon, de vejiga y de mama (Lee 1987).

#### **Productos HLA de clase II humanos HLA-DR, -DQ y -DP :**

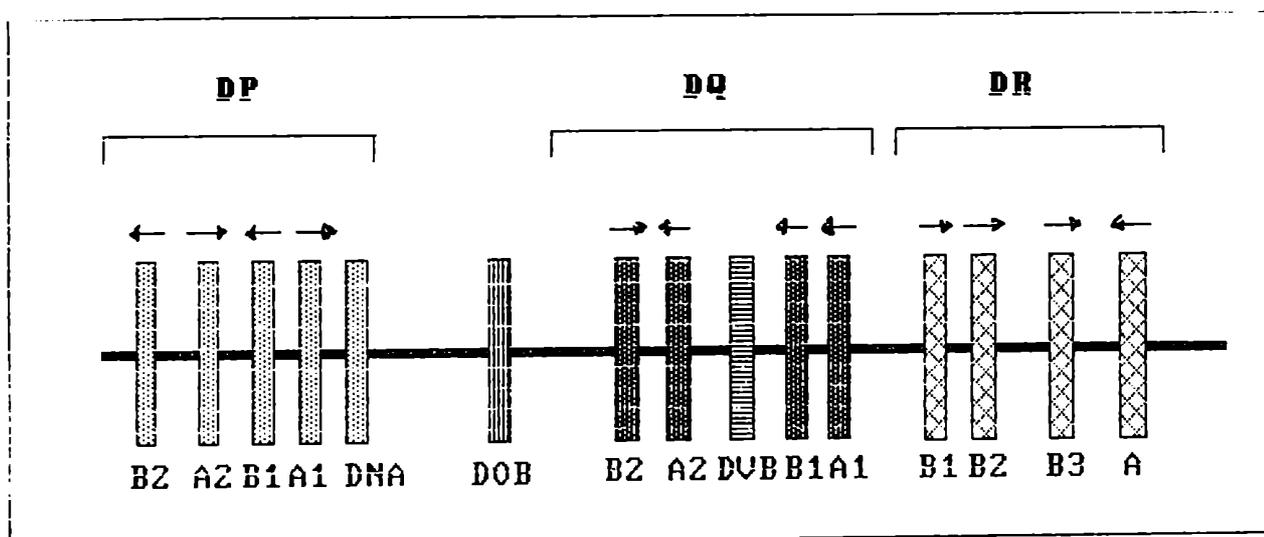
Los productos de clase II son numerosos y se caracterizan por la coexpresión simultánea de los mismos en la membrana celular de los tejidos en los cuales están presentes (Radka 1986). Todos los individuos expresan las moléculas llamadas HLA-DR, HLA-DQ y HLA-DP, cada una de ellas constituida por un dímero DR $\alpha$ /DR $\beta$ , DQ $\alpha$ /DQ $\beta$  y DP $\alpha$ /DP $\beta$ . Cada cadena está codificada por un gen respectivo en el sistema HLA, denominados DRA/DRB1, DQA1/DQB1 y DPA1/DPB1 (Fig.4). Algunos individuos expresan también un cuarto producto denominado DRw52 o DRw53, donde la cadena DR $\alpha$  es la misma a la codificada por el gen DRA y la cadena  $\beta$  es el producto de un gen denominado DRB3 ó DRB4 respectivamente (Fig.4) (Bell 1987). Como se verá posteriormente, los genes de clase II presentan un gran polimorfismo genómico, el que se evidencia en la presencia de un gran número de variantes alélicas para cada una de estas moléculas (Marsh 1989). A nivel de la membrana celular en un individuo dado se expresan en co-dominancia los dos alelos de cada gen de clase II. Se denomina haplotipo de clase II al conjunto de alelos de los genes HLA-DP, DQ y DR presentes en el cromosoma 6 y que habitualmente segregan juntos.

#### **Organización genómica de los genes de clase II:**

Como se mencionó anteriormente, los genes de clase II se encuentran comprendidos en la region HLA-D ubicada hacia la porción centromérica del sistema HLA, en el brazo corto del cromosoma 6 (Kaufman 1984). Esta región comprende aproximadamente 1000 kb y se halla ubicada a unas 350 kb del gen que codifica para la 21OH (Fig.1). Hacia la región centromérica (ver Fig.4) se halla en primer lugar en un tramo de 300 kb al gen DRA el cual codifica para la cadena DR $\alpha$ . A una distancia variable de 80-100 kb sigue un gen llamado DRB3, DRB4 ó DRB5. El producto de estos genes junto con la cadena DR $\alpha$  generan las moléculas DRw52 y DRw53

respectivamente (Bell 1987). A menos de 100 kb se localiza otro par de genes, denominados DRBII, que no es funcional, y DRBI, el gen más polimórfico de la región y que codifica para la cadena DR $\beta$ 1 de todas las moléculas HLA-DR. Resumiendo, hay un único gen DRA cuyo producto es compartido por las moléculas HLA-DR y HLA-DRw52/53.

**Figura 4:** Organización genética del sistema HLA de clase II. Se indican los loci HLA-DP, -DQ y -DR. Dentro de cada locus se muestran los genes localizados en los mismos. Las flechas indican el sentido de la transcripción de estos genes.



A una distancia de 80-240 kb (según el haplotipo) sigue hacia el centrómero la región DQ. En primer lugar, se hallan los genes DQA1 y DQB1, que codifican para las moléculas HLA-DQ. En la misma región, se halla otro par de genes DQA2 y DQB2, los cuales no parecen tener defectos estructurales, pero cuyos productos aún no han sido hallados (Lee 1987). Entre ambos pares de genes DQ, a una distancia de aproximadamente 10 kb de DQA2, se ha localizado recientemente un pseudogen para una cadena  $\beta$ , denominado DVB, el cual carece del primer dominio  $\beta$ 1 (Inoko 1989).

Hacia el centrómero, a unas 70 kb de DQB2 se halla un gen llamado DOB, cuyo RNA se expresa en muy bajos niveles en linfocitos B y se

desconoce el producto proteico (Tonelle 1985).

A unas 200 kb de DOB se halla el gen DNA (antes denominado DZ), cuyo producto no se conoce (Trowsdale 1985). Inmediatamente vecinos a este gen se hallan los genes de la región DP, los cuales se localizan en un tramo de 65 kb. Para DP se hallaron dos pares de genes (Bell 1987): DPA1 y DPB1, que codifican para el producto HLA-DP, y otro par de genes DPA2 y DPB2 los cuales no son funcionales.

#### **Mecanismos moleculares de la regulación de la expresión de los genes de clase II:**

Los mecanismos moleculares involucrados en la regulación de la expresión de los genes de clase II están comenzando a ser elucidados. La transferencia de los genes de clase II o de híbridos formados por promotores de clase II y genes "reporter" a distintos tipos celulares, ha permitido identificar en los promotores tramos de secuencia que actúan en cis, las cuales afectan cuantitativamente la expresión génica (Lee 1987). Se han postulado en estos estudios tanto elementos de control positivos como negativos. Se han detectado también proteínas de binding nucleares las cuales se unen a secuencias altamente conservadas en todos los promotores de clase II (Dorn 1987). Mutaciones que resultan en la falta de expresión de los genes de clase II en el síndrome de linfocitos B "pelados", son consecuencia de la falta de unión de estos factores proteicos a secuencias regulatorias consenso (Preval 1985). Estudios realizados en genes de clase II murinos (Dorn 1987) mostraron que para el gen de clase II E $\alpha$ k estas secuencias consenso son necesarias para la inducción por interferón gamma de este gen.

#### **Polimorfismo de las moléculas de clase II:**

Las moléculas HLA de clase II se encuentran entre las proteínas más polimórficas conocidas, con más de 50 variantes alélicas. Estos alelos son producto de la unión a nivel de la membrana celular de alguna de las variantes de las cadenas  $\alpha$  con alguna de las variantes de las cadenas  $\beta$ . Los genes que las codifican se expresan codominantemente, por lo tanto las células exhiben tanto los productos maternos como paternos, lo que da por resultado la expresión de al menos 6 moléculas de clase II

en la membrana para un individuo heterocigota para DR, DQ y DP. Además, se ha evidenciado en algunos casos la expresión en membrana de (por ejemplo) una cadena DQ $\alpha$  materna con una cadena DQ $\beta$  paterna, en un fenómeno denominado trans-asociación, lo que aumentaría el número de moléculas de clase II presentes en la célula (Giles 1985).

Las variantes polimórficas de las moléculas de clase II han sido identificadas y caracterizadas inicialmente por su capacidad de estimular la proliferación de linfocitos T alogeneicos, en un fenómeno denominado cultivo mixto linfocitario (CML). Posteriormente, se estableció que los epitopes responsables de estimular al CML se hallaban sobre las moléculas HLA-DR presentes en una fracción minoritaria de las células mononucleares de sangre periférica (monocitos y linfocitos B). Con estas células purificadas se establecieron las condiciones adecuadas para identificar las variantes alélicas de clase II por técnicas serológicas, de citotoxicidad mediada por anticuerpos y complemento. Los anticuerpos capaces de distinguir las distintas variantes HLA de clase II se hallan en suero de individuos politransfundidos o de mujeres luego de varios embarazos (nótese que en estas situaciones el organismo se expone a moléculas de histocompatibilidad "ajenas", contra las cuales se responde con la producción de anticuerpos).

Mediante las técnicas serológicas, se han definido hasta el presente 14 alelos diferentes para DR y 7 alelos para DQ (Milford 1989) (Tabla 1).

Los diversos alelos capaces de estimular la reacción de CML se denominan especificidades Dw (Floremberg 1989). Estos epitopes Dw en las moléculas de clase II no necesariamente son los mismos detectados por anticuerpos. Estos determinantes son de gran importancia clínica en el rechazo de trasplantes y se los ha llamado alelos del locus D (Bach 1986). Hasta el presente se han identificado 24 alelos diferentes (Tabla 1).

Tabla 1: Lista completa de las especificidades HLA de clase II reconocidas. "blank" se definen a todas aquellas especificidades que no generan respuesta proliferativa por cultivo mixto linfocitario secundario.

HLA-D	HLA-DR	HLA-DQ	HLA-DP
Dw1	DR1	DQw1	DPw1
Dw2	DR2	DQw2	DPw2
Dw3	DR3	DQw3	DPw3
Dw4	DR4	DQw4	DPw4
Dw5	DR5	DQw5(w1)	DPw5
Dw6	DRw6	DQw6(w1)	DPw6
Dw7	DR7	DQw7(w3)	DPw "blank"
Dw8	DRw8	DQw8(w3)	
Dw9	DR9	DQw9(w3)	
Dw10	DRw10		
Dw11(w7)	DRw11(5)		
Dw12	DRw12(5)		
Dw13	DRw13(w6)		
Dw14	DRw14(w6)		
Dw15	DRw15(2)		
Dw16	DRw16(2)		
Dw17(w7)	DRw17(3)		
Dw18(w6)	DRw18(3)		
Dw19(w6)			
Dw20	DRw52		
Dw21			
Dw22	DRw53		
Dw23			
Dw24			
Dw25			
Dw26			

A diferencia de los estudios realizados para DQ y DR, los análisis de variación alélica para el locus DP han presentado complicaciones debido a la falta de reactivos serológicos y la baja estimulación de linfocitos T en CML primario. Estas moléculas HLA-DP fueron originalmente definidas por su capacidad de estimular una fuerte respuesta secundaria en cultivo mixto, donde las células T respondedoras son pre-estimuladas in vitro (PLT= "primed lymphocyte typing"). Mediante esta técnica ha sido posible definir 6 especificidades DP (Shaw 1980, Hartzman 1984) (Tabla 1).

Los distintos alelos HLA de clase II fueron identificados por reacciones serológicas y de CML y definidos a lo largo de 10 Talleres Internacionales de Histocompatibilidad. En los últimos Talleres se han incorporado nuevas metodologías para caracterizar las distintas variantes de clase II: isoelectroenfocado, geles de poliacrilamida (Knowles 1989), polimorfismo de los fragmentos de restricción (RFLP) en el DNA (Cohen 1989) y determinación de la secuencia nucleotídica de los genes (Gregersen 1989).

Dentro de la región DR, se ha establecido que el locus DRA presenta escaso polimorfismo (Lee 1982). Existen cuatro loci DRB cuyos productos se expresan en moléculas de clase II, denominados DRB1, DRB3, DRB4 y DRB5 (Winchester 1980). El locus DRB1 está presente en todos los haplotipos y exhibe un enorme polimorfismo, con más de 40 alelos presentes. El locus DRB3 está presente en algunos haplotipos (DR3, 5, 6 y 8), codifica para las llamadas moléculas DRw52 y presenta 4 alelos. El locus DRB4 sólo está presente en los haplotipos DR4, 7 y 9, codifica para la llamada molécula DRw53 y no exhibe polimorfismo. El locus DRB5 sólo está presente en individuos portadores del haplotipo DR2 y hasta el presente se han identificado 4 alelos del mismo (Lee 1987). El locus DRB2 posee un pseudogen, está presente en algunos individuos y ausente en otros. Como se ve, el polimorfismo del sistema no sólo afecta en cambios puntuales a un producto génico sino incluye grandes variaciones, con la presencia de distinto número de genes en distintos individuos. La región DQ presenta polimorfismo tanto en el locus DQA1 como en el DQB1 (Trucco 1986). La región DP presenta escaso polimorfismo a nivel del gen DPA1 y un amplio polimorfismo en el gen DPB1 (Bugawan 1988).

En las moléculas de clase II la mayor parte de polimorfismo se encuentra localizado particularmente en el primer dominio  $\alpha 1$  y  $\beta 1$  (Bell

1987, Marsh 1989, Bugawan 1988). Dentro del mismo se han podido definir regiones particulares de extenso polimorfismo ( Benoit 1983) las cuales fueron denominadas regiones de hipervariabilidad alélica (AHVR). En los genes DRB hay 3 AHVR. Estas se ven entre los residuos 9 y 13, 26 y 33, y 67 y 74 (Fig.5). Se puede observar variación adicional en las posiciones 37 y 38, 47 y 56 a 60. Este patrón puede también observarse en los alelos DQA y DQB, aunque difieren en el número de regiones hipervariables (Fig.6). Hay una sola región AHVR para DQ $\alpha$  (posiciones 45 a 56) y dos AHVR en DQ $\beta$  (53 a 57 y 66 a 77). El polimorfismo en el locus DP $\beta$  permite localizar 5 regiones con sólo dos o tres aminoácidos diferentes en cada posición polimórfica (Fig.7); mientras que DP $\alpha$  presenta escaso polimorfismo, el cual genera dos variantes alélicas las cuales difieren en 3 aminoácidos la una de la otra (Bugawan 1988).

#### Origen del polimorfismo de los genes de clase II:

El origen y mantenimiento del extenso polimorfismo de los genes de clase II ha sido objeto de numerosas controversias. La presencia de regiones de extensa variabilidad (AHVR) intercaladas con zonas altamente conservadas en todas las moléculas, sugiere la existencia de mecanismos de recombinación homóloga recíproca o no recíproca. Estudios realizados en genes de clase II de ratón (Mc Intyre 1984) han aportado fuertes evidencias de fenómenos de recombinación no recíproca o conversión génica. Este mecanismo involucra la copia de tramos de información del DNA (durante la replicación del mismo) a partir de genes homólogos. Los genes interactuantes pueden estar en el mismo cromosoma o en cromosomas distintos. Un ejemplo claro de esto es lo que ocurre en los haplotipos HLA-DR3 y HLA-DRw13. Estudios de reactividad serológica y de patrones de restricción por la técnica de Southern Blot muestran que ambos presentan un origen evolutivo común (Angellini 1984). Las secuencias nucleotídicas de los dominios polimórficos de los dos loci activos DRB1 y DRB3 de los haplotipos DR3 y DRw13 muestran que el locus DRB1 del alelo HLA-DR3 pudo ser generado mediante el intercambio de dos segmentos cortos de DNA de los loci DRB1 y DRB3 pertenecientes al haplotipo DRw13 (Gorski 1986). Un esquema de este evento de conversión génica se muestra en la Figura 8 en donde el

Figura 5: Secuencia aminoacídica del primer dominio de las distintas variantes alélicas del locus DRB. AHVR 1,2 y 3 son las regiones de hipervariabilidad alélica.

		AHVR1	AHVR2	AHVR3						
		-----	-----	-----						
		10	20	30	40	50	60	70	80	90
DRB1*0101	DR1 Dw1	RFLWQLKFECHFFNGTERVRLLERCIYNQEE	SVRFDSDVGEYRAVTELGRPD	AEYWN	SQKDLLEQRRAAVD	TYCRHNYGVGESFTVQRR				
DRB1*0102	Dw2	-----AV-----								
DRB1*0103	DR 8r	-----I--DE-----								
DRB1*1501	DR2 Dw2	---P-R---	---F-D-YF---		---F---		---I--A---		---V---	
DRB1*1502	Dw12	---P-R---	---F-D-YF---		---F---		---I--A---			
DRB1*1601	Dw21	---P-R---	---F-D-YF---				---F--D---			
DRB1*1602	Dw22	---P-R---	---F-D-YF---				---D---			
DRB1*0301	DR3 (DRw17)	---EYSTS---	---Y-D-YFH---	---N---	---F---		---K-GR--N---		---V---	
DRB1*0302	(DRw18)	---EYSTS---	---F--YFH---	---N---			---K-GR--N---			
DRB1*0401	DR4 Dw4	---E-V-H---	---F-D-YF-H---	---Y---			---K---			
DRB1*0402	Dw10	---E-V-H---	---F-D-YF-H---	---Y---			---I--DE---			
DRB1*0403	Dw13	---E-V-H---	---F-D-YF-H---	---Y---			---E---			
DRB1*0404	Dw14	---E-V-H---	---F-D-YF-H---	---Y---			---V---			
DRB1*0405	Dw15	---E-V-H---	---F-D-YF-H---	---Y---		---S---				
DRB1*0406	DKT2	---E-V-H---	---F-D-YF-H---				---E---			
DRB1*0407	Dw13	---E-V-H---	---F-D-YF-H---	---Y---			---E---			
DRB1*0408	Dw14	---E-V-H---	---F-D-YF-H---	---Y---						
DRB1*1101	DR5 (DRw11)	---EYSTS---	---F-D-YF---	---Y---	---F---	---E---	---F--D---			
DRB1*1102	(DRw11)	---EYSTS---	---F-D-YF---	---Y---	---F---	---E---	---I--DE---			---V---
DRB1*1103	(DRw11)	---EYSTS---	---F-D-YF---	---Y---	---F---	---E---	---F--DE---			---V---
DRB1*1104	(DRw11)	---EYSTS---	---F-D-YF---	---Y---	---F---	---E---	---F--D---			---V---
DRB1*1201	(DRw12)	---EYSTG--Y---	---HFH---	---LL---	---F---	---V--S---	---I--D---			---AV---
DRB1*1201	DRw12b	---EYSTG--Y---	---HFH---	---LL---	---F---	---V--S---	---F--D---			---AV---
DRB1*1301	DR6 (DRw13-Dw18)	---EYST---	---F-D-YFH---	---N---	---F---		---I--DE---			---V---
DRB1*1302	(DRw13-Dw19)	---EYSTS---	---F-D-YFH---	---N---	---F---		---I--DE---			
DRB1*1401	(DRw14-Dw9)	---EYSTS---	---F-D-YFH---	---F---		---A--H---	---R--E---			---V---
DRB1*1402	(DRw14-Dw16)	---EYSTS---	---F--YFH---	---N---						
DRB1*0701	DR7 Dw17	---G-YK---	---GF--LF---	---F---		---V--S---	---I--D--GQ---			---V---
DRB1*0702	DB1	---G-YK---	---GF--LF---	---F---		---V--S---	---I--D--GQ---			---V---
DRB1*0801	DRw8 Dw8.1	---EYSTG--Y---	---F-D-YF---	---Y---		---S---	---F--D--L---			
DRB1*0802	Dw8.2	---EYSTG--Y---	---F-D-YF---	---Y---			---F--D--L---			
DRB1*0803	Dw8.3	---EYSTG--Y---	---F-D-YF---	---Y---		---S---	---I--D--L---			
DRB1*0901	DR9	---K-D---	---Y-H-G---	---N---		---V--S---	---F--R--E---			---V---
DRB1*1001	DRw10	---EEV---	---RVH---	---YA-Y---			---R---			
DRB1*1001	DR(New)	---EYSTS---	---F--YFH---	---N---			---D--L---			
DRB3*0101	DRw52a	---ELR-S---	---Y-D-YFH---	---FL---		---V--S---	---K-GR--N---			
DRB3*0201	b	---EL--S---	---F--HFH---	---YA---	---R---		---K-GQ--N---			---V---
DRB3*0202	b	---EL--S---	---F--HFH---	---YA---	---R---		---K-GQ--N---			
DRB3*0301	c	---EL--S---	---F--YFH---	---F---		---V--S---	---K-GQ--N---			---V---
DRB4*0101	DRw53	---E-A-C---L---	---WN-I-Y---	---YA-YN--L---	---Q---		---R--E---		---Y---	---V---
DRB5*0101	DR2 Dw2	---Q-D-Y---	---F-H-D---	---DL---			---F--D---			
DRB5*0102	Dw12	---G-D-Y---	---F-H-G---	---N---			---F--D---			
DRB5*0201	Dw21	C--G-D-Y---	---F-H-G---	---N---			---I--A---			---AV---
DRB5*0202	Dw22	C--G-D-Y---	---F-H-G---	---N---			---I--A---			---AV---



Figura 7: Secuencia polipeptídica del primer dominio polimórfico de los alelos de los loci DQA1 (a) y DQB1 (b).

a)

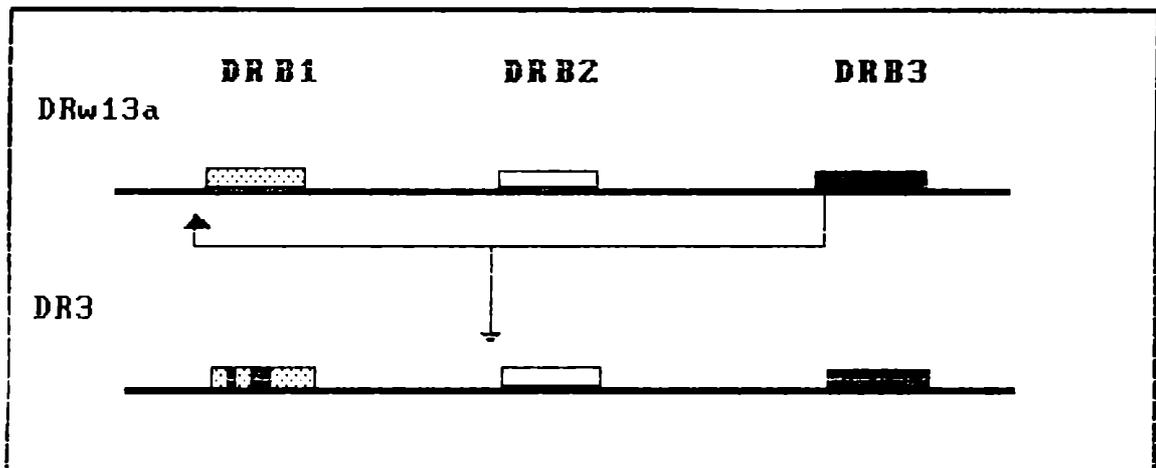
Alelos	Secuencia polipeptídica																																																																										
	10	20	30	40	50	60	70	80	90																																																																		
DPA1 0101	D	H	V	S	T	Y	A	F	V	Q	T	H	R	P	T	G	E	F	M	F	E	D	E	M	F	Y	V	D	L	K	K	E	T	V	M	H	L	E	E	F	G	Q	A	F	S	F	E	A	Q	G	L	A	N	I	A	I	L	N	N	N	L	N	T	L	I	Q	R	S	N	H	T	Q	A	T	N
DPA1 0102	-----																																																																										
DPA1 0103	-----																																																																										
DPA1 0201	-----Q-----R-----A-----																																																																										

b)

	10	20	30	40	50	60	70	80	90																																																																							
DPB1 0101	V	Y	D	G	R	O	E	C	Y	A	F	N	G	T	Q	R	F	L	E	R	Y	I	N	R	E	E	Y	A	R	F	D	S	D	V	G	E	F	R	A	V	T	E	L	G	R	P	A	E	Y	N	S	Q	K	D	I	L	E	E	K	R	A	V	P	D	R	V	C	R	H	N	Y	E	L	D	E	A	V	T	L	Q
DPB1 0201	L	F	-----FV-----DE-----E-----M-----GGPM---																																																																													
DPB1 0202	L	F	-----LV-----E-----E-----M-----GGPM---																																																																													
DPB1 0301	--L	-----FV-----DED-----L-----																																																																														
DPB1 0401	L	F	-----F-----M-----GGPM---																																																																													
DPB1 0402	L	F	-----FV-----DE-----M-----GGPM---																																																																													
DPB1 0501	L	F	-----LV-----E-----M-----																																																																													
DPB1 0601	--L	-----FV-----DED-----L-----E-----M-----																																																																														
DPB1 0801	L	F	-----FV-----DE-----E-----																																																																													
DPB1 0901	-H-L	-----FV-----DED-----E-----																																																																														
DPB1 1001	-H-L	-----FV-----DE-----E-----																																																																														
DPB1 1101	--L	-----Q-----L-----R-----M-----																																																																														
DPB1 1301	--L	-----E-----I-----																																																																														
DPB1 1401	-K-L	-----FV-----DED-----L-----																																																																														
DPB1 1501	--L	-----Q-----L-----R-----M-----VGPM---																																																																														
DPB1 1601	L	F	-----FV-----DE-----E-----M-----																																																																													
DPB1 1701	-H-L	-----FV-----DED-----E-----M-----																																																																														
DPB1 1801	--L	-----FV-----DE-----M-----VGPM---																																																																														
DPB1 1901	L	F	-----FV-----E-----E-----I-----																																																																													

dominio polimórfico del locus DRw13 DRB3 actúa como donante y el DRB1 actúa como receptor, lo que genera la secuencia del gen DR3. Como es esperado, por este mecanismo los loci DRB3 de los haplotipos HLA-DR3 y HLA-DRw13 son idénticos.

**Figura 8:** Representación esquemática del evento de conversión génica intracromosomal entre dos genes que codifican para las cadenas beta del loci DRw13. La flecha muestra la dirección en que ocurrió este evento generando una nueva cadena DRB1 con la especificidad DR3. El gen no está esquematizado en intrones y exones.



Como consecuencia de estos mecanismos de diversificación, todas las moléculas de clase II presentan un alto porcentaje de homología (Bell 1987, Gyllesten 1990). La selección juega un papel importante en la fijación de estos polimorfismos en la población, pero los mecanismos exactos por los cuales se establecen estas variaciones permanecen aún oscuros. Las zonas de AHVR podrían haberse generado por mutaciones puntuales de un único par de bases seguido por un evento de conversión génica o de recombinación homóloga (Gorski 1986, Lee 1987).

La historia evolutiva del polimorfismo en los loci DQA1, DQB1 y DRB1 parece ser bastante diferente y refleja diferentes mecanismos genéticos y presiones de selección para los distintos loci. Estudios

comparativos a nivel de secuencias nucleotídicas del dominio polimórfico del locus DQ $\beta$  en el hombre y en especies cercanas al hombre (Gyllesten 1990) (monos, gorilas y chimpanzé) muestran que muchos de los tipos alélicos (DQw1,2,3 y 4) han persistido por largos periodos de tiempo (al menos 20 millones de años) previo a la especiación y mantenidos por alguna forma de selección. Por otro lado, los subtipos o "splits" provenientes de los mismos son más recientes y específicos de especie. En el caso del locus DQA1 sucede algo similar que para DQB1: el polimorfismo en el locus DQA1 refleja el mantenimiento de antiguos tipos alélicos con cambios mínimos en la secuencia por más de 5 millones de años y la aparición de nuevas subvariantes luego de la especiación (Gyllesten 1989). El rol de la transferencia de segmentos en la generación de la diversidad alélica se encuentra más dramáticamente ilustrado en la evolución del locus DR $\beta$ . En este, el patrón de polimorfismo encontrado proviene de eventos de recombinación intra exónicos entre segmentos conservados y antiguos que codifican la lámina  $\beta$  plegada y segmentos más recientemente generados que codifican para la hélice en el dominio  $\alpha 2$  (Erlich 1991).

La activa evolución de estos genes sería de fundamental importancia para garantizar en la especie una mayor eficiencia la presentación antigénica y el reconocimiento T, disminuyendo la probabilidad de que un microorganismo capaz de mutar sus epitopes evite la asociación de los mismos a las moléculas de histocompatibilidad. Como se mencionó anteriormente, el mayor número de cambios se localiza en el sitio de presentación antigénica, lo que apoyaría esta teoría.

#### **Tipificación del sistema HLA:**

Se denomina tipificación a la determinación del fenotipo HLA que presenta un individuo. La identificación de los alelos se realiza por reacciones serológicas, fundamentalmente de citotoxicidad mediada por anticuerpos y complemento. Se debe disponer de una colección muy amplia de antisueros capaces de identificar todas las variantes HLA. Los antisueros se obtienen de mujeres multíparas y de individuos politransfundidos (Payne 1957). El análisis para la identificación de las especificidades de estos sueros es muy complejo ya que los mismos contienen numerosos anticuerpos con múltiples especificidades hacia los

productos de los distintos loci del sistema HLA. La producción de anticuerpos monoclonales a partir de hibridomas murinos o humanos (Kohler 1975) ha contribuido muy parcialmente a la identificación de los alelos HLA. Para tipificar los alelos de clase I y clase II se parte de linfocitos de sangre periférica obtenidos por gradiente de Ficoll-Hypaque. Para los alelos de clase I, las células se incuban con los antisueros en policubetas donde cada fosita posee un suero distinto, se agrega luego complemento y después de otra incubación se analiza la viabilidad de las células al microscopio (Terasaki 1969). Las células serán lisadas en aquellas fosas en las cuales se encuentra el antisuero portador de la especificidad hacia el alelo expresado en la superficie celular. Si el individuo es heterocigota, habrá lisis en fosas que contienen antisueros contra dos especificidades distintas para un locus dado. En caso de hallarse sólo un alelo para un dado locus, el individuo podría ser homocigota o portar un alelo no reconocido por los antisueros sembrados en la policubeta. La tipificación de las moléculas de clase II DR y DQ también se lleva a cabo por la técnica de citotoxicidad mediada por anticuerpo y complemento, pero la misma se realiza sobre linfocitos B purificados o mediante técnicas combinadas de citotoxicidad y doble fluorescencia que permitan la visualización simultánea de linfocitos T y B (van Rood, 1978). Los alelos del locus D, como se mencionó anteriormente, se tipifica por cultivo mixto linfocitario mediante un panel precharacterizado de células homocigotas para cada uno de los alelos conocidos de este locus (Floremberg 1989). Estas células (irradiadas para evitar su mitosis) se usan para estimular la proliferación en cultivo de los linfocitos a tipificar: responderán ante los alelos diferentes y no responderán ante los alelos idénticos. Las moléculas HLA-DP poseen epitopes que estimulan debilmente la proliferación de los linfocitos T, por lo que se los debe preestimar in vitro y realizar una suerte de cultivo mixto linfocitario secundario (Shaw 1980, Hartzman 1984).

Mediante el uso de la técnica del Southern, también es posible analizar la variabilidad genética del sistema HLA a través de los patrones generados por el uso de enzimas de restricción (RFLP) y la hibridización con sondas moleculares correspondientes a los distintos genes HLA. Mediante esta técnica se han hallado numerosas correlaciones entre alelos identificados por serología y RFLP así como también se han

descripto variantes no detectadas por serología (Immunobiology of HLA, Springer Verlag, 1989). Con el conocimiento de la secuencia de los dominios polimórficos de los alelos HLA, ha sido posible la síntesis de oligonucleótidos específicos de cada alelo, y pueden ser utilizados para la hibridización de los productos de amplificación enzimática mediada por polimerasa (PCR) de los genes HLA (Saiki 1988, Le Call 1986). La combinación de esta técnica junto con la hibridización con oligonucleótidos específicos ha permitido la tipificación de muestras a partir de cantidades mínimas de DNA.

#### **HLA y genética poblacional:**

La frecuencia de distribución de los distintos alelos HLA varía según el grupo étnico estudiado (Helmuth 1990, Kohonen Corish 1986, Tsuji 1986). Es decir, un determinado alelo HLA puede ser muy frecuente en orientales pero ser poco frecuente o no encontrarse en sajones. Por ejemplo, el antígeno HLA-DR2 presenta una alta frecuencia en los indios americanos (46%). Esta frecuencia disminuye al 36% en la población japonesa, 28% en los negros americanos, 25% en los caucasoides europeos, 17% en los judíos ashkenazi y 14% en los mejicanos (Tiwari 1985). Se ha observado también variaciones en la frecuencia de los antígenos HLA dentro de áreas geográficas pequeñas. Como veremos posteriormente, la variación racial de la frecuencia de los antígenos HLA tiene un efecto significativo en la fuerza de las asociaciones de los mismos a determinadas enfermedades (Tiwari 1985).

La frecuencia teórica para calcular la presencia simultánea de un alelo de un locus junto a otro alelo de otro locus en una determinada población, se calcula multiplicando las frecuencias individuales de esos alelos en la población. Si el valor de las frecuencias conjuntas presenta diferencias significativas respecto de la frecuencia observada (el producto de las frecuencias alélicas individuales), se dice que los dos alelos se encuentran en desequilibrio de ligamiento (Tiwari 1985). Este fenómeno se debe al hecho de que loci cercanos en el genoma segregan juntos con más frecuencia que la esperada por el azar. Por ejemplo: el HLA-B8 está presente en el 15% de los blancos caucásicos, y el alelo HLA-DR3 se halla en el 20%. La proporción de individuos HLA-B8, DR3 será entonces:  $0.15 \times 0.20 = 0.03$  (3%). Sin embargo, esta

combinación se halla en un 7% de la población (Tiwari 1985). Por lo tanto los alelos HLA-B8 y HLA-DR3 se hallan en desequilibrio de ligamiento.

#### **Asociación entre HLA y enfermedad:**

Desde hace más de 15 años se ha establecido que una variada gama de patologías se desencadenan preferentemente en individuos que heredan determinados alelos del sistema HLA ya sea de clase I como de clase II (Sejgaad 1980). Muchas de estas patologías, aunque no todas, involucran la participación del sistema inmune como en el caso de enfermedades infecciosas y autoinmunes.

Se han propuesto numerosos mecanismos para explicar las asociaciones HLA y enfermedad (Tiwari 1985):

- a) Las moléculas de histocompatibilidad podrían actuar como receptores para organismos patógenos (por ej. virus).
  
- b) Las estructuras moleculares de determinados agentes infecciosos podrían ser similares a las moléculas de histocompatibilidad presentes en la membrana celular. Esto conduciría a que el organismo hospedador no sea capaz de reconocer a los microorganismos como extraños y por lo tanto no se inicie la respuesta inmunológica hacia los mismos (mimetismo antigénico).
  
- c) Las moléculas HLA podrían tener estructuras similares a las presentes en los receptores para ciertas hormonas. Esto podría causar competencia entre el antígeno HLA y el receptor para la hormona. Estas interacciones, bajo ciertas condiciones, podrían conducir a enfermedades no inmunológicas.
  
- d) En enfermedades autoinmunes se ha postulado la hipótesis que determinados antígenos HLA por unión a moléculas extrañas podrían generar una relación "hapteno-carrier". La misma podría dirigir la respuesta inmunológica contra los tejidos propios.
  
- e) Los antígenos HLA podrían no estar involucrados en la causa de la

enfermedad, sino que podrían ser marcadores para los verdaderos genes de susceptibilidad, los cuales presentarían desequilibrio de ligamiento con ciertos alelos HLA. Existen en el sistema HLA genes que codifican para otras moléculas de relevancia inmunológica (por ej. el factor de necrosis tumoral, genes del sistema complemento, etc.). La hiperplasia adrenal congénita es una enfermedad autosómica recesiva producto de una deficiencia en el gen que codifica para la 21OH. Este gen se localiza en los loci de clase III del sistema HLA, muy cercano al locus HLA-B. En particular, existe un fuerte desequilibrio de ligamiento entre el gen de la 21OH deficiente y el gen que codifica para el alelo HLA-Bw47. Por lo tanto, éste alelo HLA-B actuaría como marcador para el gen 21OH defectivo (Dupont 1977).

El hallazgo de una asociación entre una patología y el sistema HLA surge cuando al tipificar un grupo de pacientes, un determinado alelo se halla en una frecuencia significativamente elevada respecto de un grupo de controles normales del mismo grupo étnico que habitan en la misma zona geográfica. Debido a que la frecuencia de ciertos alelos varía en distintos grupos étnicos, se puede mensurar la fuerza de la asociación independientemente de la frecuencia del alelo. Se define así el "riesgo relativo" (RR) que indica cuantas veces es más frecuente la enfermedad en individuos portadores de un determinado marcador respecto de aquellos individuos que no lo portan. La fórmula utilizada es la siguiente:

$$RR = a \times b / c \times d$$

a = nro. de pacientes portadores del alelo.

b = nro. de controles negativos para el alelo.

c = nro. de controles portadores del alelo.

d = nro. de pacientes negativos para el alelo.

Si las frecuencias son similares en pacientes y controles el valor de RR se aproxima a la unidad. Si RR es menor que la unidad y se aproxima a cero, entonces este alelo es menos frecuente en pacientes que en controles y se habla de un alelo "protector". La significancia estadística de la diferencia de RR de la unidad se calcula por el test

de Chi cuadrado de Fisher (Tiwari 1985), en donde el nivel de significación está medido en términos de probabilidad (p). A menor p ( $p < 0.05$ ), mayor es la seguridad que el valor RR estimado no es diferente de la unidad por azar.

#### **Enfermedades autoinmunes:**

Algunas de las asociaciones HLA de clase II y patologías autoinmunes se muestran en la Tabla 2 (Todd 1988). Como se puede observar, en la población sajona un individuo portador del fenotipo HLA-DR3,4 presenta una mayor predisposición a la diabetes insulino dependiente (RR= 20) que un individuo portador del alelo HLA-DR2 (RR= 0.25).

Con el desarrollo de nuevas técnicas en genética molecular y la posibilidad de estudiar la secuencia nucleotídica de los alelos asociados a las enfermedades, se ha podido conocer en más detalle la real asociación de los alelos HLA a las mismas. Un ejemplo claro de esto lo constituyen los estudios realizados en diabetes insulino dependiente en los últimos 3 años. Se conocía desde hace tiempo la asociación con los alelos HLA-DR3 y DR4 y la asociación negativa con el alelo HLA-DR2. Con la determinación de la secuencia nucleotídica de los 12 alelos para DQ $\beta$  y 8 para DQ $\alpha$  se pudo concluir que en esta enfermedad la real asociación es con la molécula HLA-DQ (Todd 1987). Todos los haplotipos de riesgo se caracterizan por poseer una cadena DQ $\beta$  en donde el residuo 57, que habitualmente es ácido aspártico en los alelos no asociados, ha sido reemplazado por otro aminoácido neutro. De esta forma, los alelos que poseen aspártico en la posición 57 actuarían como protectores, siendo este efecto dominante y los que carecen de aspártico, como alelos de riesgo siendo este efecto recesivo.

La fuerza de las asociaciones a enfermedades varía en los distintos grupos étnicos pero en general son los mismos alelos los asociados (Palavecino 1990, Zoschke 1986). De todas formas, solo una pequeña proporción de los individuos portadores de los alelos de riesgo desarrollan la enfermedad (baja penetrancia). Estudios de asociación realizados en hermanos HLA idénticos y en gemelos univitelinos, mostraron una discordancia de alrededor del 10 al 50% (según la enfermedad), indicando la participación de otros factores genéticos y

ambientales que contribuyen al desarrollo de muchas de estas patologías (Tiwari 1985).

Tabla 2: Asociaciones de entre los alelos HLA y enfermedades autoinmunes (Todd 1988). RR= riesgo relativo.

Enfermedad	Alelo de clase II	RR
Enfermedad celiaca	DR3	8-12
	DR7	2.5
	DQw2	25
Diabetes insulino dependiente	DR3	4-6
	DR4	4-6
	DR3,4	20
	DR2	0.25
Artritis reumatoidea	DR4	4-6
	DR1	
Myastemia gravis	DR3	2.5
	DR7	
Esclerosis múltiple	DR2	4
Pemphigus vulgaris	DR4	24
	DR6	1.5
Lupus eritrematoso sistémico	DR2	1-2
	DR3	2-3

## ENFERMEDAD CELIACA.

### Definición y características:

La enfermedad celiaca (EC), es una de las principales causas de la malabsorción intestinal en los países desarrollados. Está causada por una respuesta inmunopatológica a la presencia de glúten en el lumen intestinal. Esta proteína es el componente esencial de numerosos cereales, especialmente trigo, centeno, cebada y avena.

La enfermedad cursa con alteraciones estructurales y funcionales del intestino delgado causando malabsorción de nutrientes. Las características histológicas más relevantes a nivel intestinal son las siguientes (Lee 1980):

- Cambios degenerativos a nivel de los enterocitos o células absorptivas epiteliales, las cuales pierden su forma de altas columnas y se ven drásticamente reducidas en altura. El citoplasma de las mismas se transforma en basófilo y los núcleos toman formas y orientación irregulares. Las microvellosidades presentan falta de crecimiento y desarrollo.

-Es de considerable interés el marcado incremento de linfocitos intraepiteliales, en algunos casos los mismos igualan o exceden en número a los enterocitos presentes y dan la impresión de un gran incremento de células en la superficie del epitelio. En contraste, los linfocitos se hallan dispersos en la lámina propia, en donde es muy marcada la infiltración de la misma con células mononucleares plasmáticas.

-En algunos casos, la presencia de densos infiltrados leucocitarios en la lámina propia especialmente acompañado por células linfoides atípicas evidencian el desarrollo de linfoma intestinal, una de las complicaciones más graves que puede acarrear la EC.

La exclusión absoluta del glúten en la dieta restaura en la gran mayoría de los casos la completa funcionalidad y estructura del

intestino delgado. Un retraso en el tratamiento resulta a veces en un estado refractario de mal nutrición que no responde a la dieta libre de glúten.

Las manifestaciones clínicas de la EC se evidencian por un déficit en el crecimiento y desnutrición. Los efectos clínicos se observan mayormente en niños, pero pueden aparecer en la adolescencia o en la vida adulta.

#### Diagnóstico de la enfermedad celíaca:

El diagnóstico certero aceptado actualmente es el denominado test de ESPGAN (Meeuwse 1970). El mismo consiste en el estudio histopatológico de tres biopsias consecutivas del intestino delgado:

- 1) Primera biopsia positiva.
- 2) Segunda biopsia negativa luego de un tiempo prolongado bajo dieta libre de glúten.
- 3) Tercer biopsia positiva ante el desafío con alimentos conteniendo glúten.

Todos los hermanos de un niño afectado también deben someterse a este análisis invasivo por biopsias con el fin de un diagnóstico certero temprano para evitar el desencadenamiento o la progresiva manifestación de la enfermedad.

Durante más de 30 años se han estudiado numerosos tests posibles de diagnosticar la EC de una forma menos invasiva. Los tests inmunológicos desarrollados, los cuales se basan en la medición de anticuerpos anti gliadina en suero, mostraron que si bien es posible detectar la presencia de IgG e IgA anti gliadina con una alta sensibilidad, estas pruebas detectan un alto porcentaje de falsos positivos (Labrooy, 1986; Arranz, 1986). Recientemente (Loft, 1990), ha sido desarrollada una técnica diagnóstica alternativa la cual se basa en el estudio del aumento en la cantidad de linfocitos infiltrantes en muestras de recto y jejunio 6 horas después de la estimulación con una fracción de purificada de gliadina. Este test no sólo permite diagnosticar la presencia de la

enfermedad celíaca, sino también predecir la posibilidad de que un individuo que no manifiesta aún la clínica de la EC, presente sensibilidad al glúten (caso de los hermanos de un niño afectado). Este test es de mucho valor en aquellos casos en que las biopsias intestinales son dificultosas de realizar, ya sea por la corta edad del paciente o porque en el caso de las mujeres embarazadas los rayos X están contraindicados.

#### **Asociación entre HLA y enfermedad celíaca:**

La EC es una de las patologías que presenta una fuerte asociación con determinados alelos del sistema HLA. Los primeros estudios realizados mostraron la predominancia del alelo de clase I HLA-B8 en estos pacientes (Falchuck 1972). Estudios posteriores (Keuming 1976, Scholz 1983) mostraron una fuerte asociación con el alelo de clase II HLA-DR3. DR3 presenta desequilibrio de ligamiento con HLA-B8, de ahí la presencia de este antígeno en la población celíaca. Estudios realizados en diferentes regiones (Keuming 1976, Betuel 1976, De Marchi 1979, Brautbar 1981) mostraron que las especificidades del locus DR que se asocian a la EC incluyen HLA-DR3 y DR7. En 1983, estudios realizados en la población italiana (Tosi 1983) mostraron que todos los pacientes portadores de los alelos DR3 y DR7 presentaban la especificidad HLA-DQw2 la cual se halla en fuerte desequilibrio de ligamiento con estos alelos HLA-DR. Por lo tanto, DQw2 parece ser la especificidad HLA primariamente asociada a la EC. La Tabla 3 podemos observar los riesgos relativos que presentan los alelos HLA-A1, -B8, -DR3, -DR7 y -DQw2 en la población caucasoide (Tiwari 1985). El menor riesgo relativo del alelo HLA-A1 se debe a que esta variante se encuentra en desequilibrio de ligamiento con el alelo HLA-B8. En el 4to. Workshop Latinoamericano de Histocompatibilidad (Buenos Aires, diciembre de 1985) se confirmó la asociación entre EC y HLA-DQw2, el cual se encuentra presente en más del 95% de los pacientes.

**Tabla 3: Riesgo relativo de distintos alelos HLA asociados a la EC en la población caucásica.**

ALELO HLA	RIESGO RELATIVO	No.DE ESTUDIOS
A1	3.57	15
B8	7.6	15
DR3	11.6	8
DR7	2.5-4.1	*
DQw2	>25	8

\*la asociación a la EC del alelo DR7 depende del grupo estudiado, ya que en algunos no existe tal asociación.

Otro estudio mostró que los pacientes celíacos que no son DR3 o DR7 son todos DR4, DQw3 positivos (De Marchi 1984). Por lo tanto la presunción de que DQw2 es el único alelo de riesgo quedaría descartada a menos que se asuma que la enfermedad incluye dos entidades separadas, una asociada a DQw2 (+DR3 y/o DR7) y otra asociada a DR4,DQw3.

**Expresión de antígenos de clase II en el intestino delgado de enfermos celíacos:**

En 1988, se utilizaron anticuerpos monoclonales dirigidos contra determinantes monomórficos de las moléculas HLA de clase II con los fines de investigar la expresión de los mismos sobre células del intestino delgado tanto en individuos normales como en EC (Kelly 1988). En el tejido epitelial del intestino normal hay una fuerte expresión de antígenos DR y DP en la zona apical de las vellosidades intestinales y ésta disminuye en intensidad hacia la base de las mismas. Las células epiteliales de la cripta no expresan estos antígenos. En la lámina propia también hay células positivas para DR y DP. Los antígenos HLA-DQ no se hallan presentes en las células epiteliales pero sí en la lámina propia. En los pacientes celíacos, además de un aumento en la expresión normal para estos antígenos, se encuentra expresión de HLA-DR y DP en las células de la cripta. La expresión de HLA-DQ permanece inalterada.

En los pacientes sometidos a una dieta libre de glúten, la expresión de estos antígenos es intermedia entre un paciente sin tratar y un individuo normal.

Un aumento de la expresión de estos antígenos en el epitelio intestinal de los pacientes con EC, podría tener implicancia en un aumento de la presentación antigénica, conduciendo a un aumento de la respuesta inmune a la gliadina y hacia componentes propios.

Aún cuando no está claro el mecanismo de la patogénesis, las evidencias sugieren una activa participación de componentes inmunológicos.

# OBJETIVOS

## OBJETIVOS.

El objetivo amplio de este trabajo de tesis fue estudiar las bases serológicas y moleculares de la asociación de la enfermedad celíaca pediátrica y el sistema HLA. Específicamente se estudiaron los siguientes aspectos:

a) Se determinaron por técnicas serológicas los alelos HLA-A, B, C, DR y DQ en 62 enfermos celíacos pediátricos argentinos. Teniendo en cuenta que los alelos HLA asociados a esta patología varían en distintos grupos étnicos, resultaba importante en primer lugar definir la asociación para pacientes pediátricos en nuestro medio, donde la enfermedad tiene una frecuencia aproximada de 1/1800. El alelo DQw2 está presente en más del 95% de los pacientes celíacos pediátricos argentinos; sin embargo, los alelos HLA-DR asociados, difieren de los presentes en otras poblaciones.

b) Se caracterizaron mediante hibridización genómica de Southern los patrones polimórficos de restricción (RFLP) de los genes HLA de clase II DRB, DQA, DQB, DPA y DPB de pacientes celíacos, y se comparó con aquellos de individuos normales. Este estudio, se realizó en el contexto del X Workshop Internacional de Histocompatibilidad, donde varios laboratorios analizaron en forma cooperativa los patrones RFLP de los genes HLA en distintos grupos étnicos. Esto permitió definir correlaciones entre serología y patrones RFLP y hallar variantes genómicas para alelos no distinguibles por serología.

c) Los alelos HLA de clase II asociados a celíacos argentinos fueron confirmados por amplificación genómica (PCR) e hibridización con oligonucleótidos específicos de alelo. Los resultados obtenidos permitieron explicar las bases genéticas del aumento del fenotipo DR5/7 en nuestro medio.

d) Se determinó la secuencia nucleotídica de los dominios polimórficos de los genes DRB, DQA y DQB de dos pacientes celíacos pediátricos argentinos, portadores de alelos HLA no asociados en celíacos de otros grupos étnicos.

e) Excepcionalmente, menos del 5% de los pacientes no son portadores del alelo de riesgo HLA-DQw2. Se estudiaron en estos individuos los dominios polimórficos de los genes DRB, DQA y DQB, mediante amplificación genómica, hibridización con oligonucleótidos específicos y determinación de la secuencia nucleotídica. Esto permitió confirmar la ausencia de las cadenas DQA y DQB de riesgo y definir en otros alelos HLA-DQ tramos de su estructura comunes a las moléculas de riesgo, que podrían ser críticos en la asociación a patología.

El estudio de los alelos HLA asociados a la EC y la búsqueda de posibles diferencias a nivel molecular de los genes que codifican para estos alelos HLA respecto de aquellos asociados negativamente a la enfermedad, nos permitiría entender mejor los mecanismos inmunológicos involucrados en el desarrollo de la EC. Además, esto podría contribuir al desarrollo de una estrategia diagnóstica alternativa, para identificar a los niños afectados y sus familiares portadores de los alelos de riesgo.

MATERIALES  
Y  
MÉTODOS

## TIPIFICACION SEROLOGICA DE LOS ALELOS HLA

a) **Alelos de clase I:** La técnica utilizada para la caracterización de los alelos HLA-A, -B y -C presentes en un individuo es la de Terasaki (1969) de citotoxicidad mediada por anticuerpos y complemento. Los sueros utilizados para este estudio se obtienen de mujeres multíparas o de hibridomas murinos, que son sometidos a una rigurosa caracterización, a través de workshops internacionales, de las especificidades HLA que son capaces de reconocer. Un mismo alelo presente en dos individuos distintos, no siempre presenta el mismo patrón de reactividad. Por ello, se usan varios sueros contra cada alelo, lo que resulta en el uso de más de 100 sueros para cada estudio. Brevemente: los sueros se colocan cada uno en pocillos de policubetas plásticas, las cuales luego se mantienen congeladas hasta su uso. Se agregan luego a cada pocillo linfocitos obtenidos a partir de sangre periférica (que expresan altos niveles de moléculas HLA en su superficie) y luego de una breve incubación se agrega complemento. Se visualizan los pocillos mediante un microscopio y se determinan aquellos que contienen células vivas y muertas, distinguibles mediante el uso de colorante vital.

b) **Alelos de clase II:** Los antígenos HLA-DR y -DQ también se tipifican por citotoxicidad dependiente de anticuerpo y complemento (van Rood, 1978), pero la reacción se hace identificando linfocitos B por doble fluorescencia, ya que expresan altos niveles de moléculas de clase II y sólo representan el 5-15 % de los linfocitos periféricos. Los sueros al igual que para clase I, son obtenidos a partir de mujeres multíparas o de hibridomas murinos y pasan por los mismos controles de selección a través de workshops internacionales que los avalen para su uso y especificidad.

### EXTRACCION DE DNA A PARTIR DE LINFOCITOS DE SANGRE PERIFERICA

El protocolo utilizado es el enviado por la Comisión Organizadora del X Workshop Internacional de Histocompatibilidad (Bo Dupont 1989).

Se colecta entre 10 y 30 ml. de sangre periférica a la cual se le agrega heparina como anticoagulante. Se elimina el plasma luego de

centrifugar a 1500 rpm durante 5 min. Se le agregan 2 volúmenes de buffer de lisis de glóbulos rojos (10 mM Tris pH 7.6, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM NaCl) y se mezcla por inversión y luego de centrifugar a 1500 rpm por 5 min. Se resuspende el pellet en buffer de lisis de glóbulos rojos y se repite la centrifugación. Se resuspende el pellet en 2 ml de buffer de lisis de glóbulos rojos y 15 ml de buffer de lisis de glóbulos blancos (10 mM Tris pH 7.6, 10 mM EDTA pH 8, 50mM NaCl, 0.2% SDS y 100 ug/ml de proteinasa K). Se incuba 6-18 hs a 42C. Se extrae 2 veces el DNA con un volumen de fenol-cloroformo (3:1) y 2 veces con un volumen de cloroformo-isoamil alcohol (24:1). Se agrega 5 M NaCl hasta una concentración final de 60 mM y se permite la precipitación del DNA agregando un volumen de isopropanol 100%. Se lava el precipitado dos veces con etanol 70%. Se seca en vacío y se resuspende el DNA en 1 mM Tris, 0.1 mM EDTA. Se mide concentración del DNA por espectrofotómetro a 260 nm (1 OD= 40 ug/ml).

### SOUTHERN BLOT

En un tubo Eppendorff se agrega la cantidad de DNA a digerir (entre 7-10 ug de DNA por calle de gel), buffer de digestión (específico de cada enzima) 10x hasta concentración final 1x, 5 U de enzima por ug de DNA y H<sub>2</sub>O para completar el volumen final de la digestión (100 ul). Se incuba 18 hs a la temperatura óptima de la enzima utilizada. La digestión se finaliza por el agregado de 5x buffer de siembra (50 mM Tris pH 7.6, 50 mM EDTA, 0.5% SDS, 0.1% azul de bromo fenol, 15% sacarosa) hasta una concentración final de 1x. La muestra se concentra bajo vacío hasta un volumen apropiado para la siembra en el gel (40 a 60 ul).

Se prepara un gel de agarosa de concentración final entre 0.6-0.9% (dependiendo del tamaño de fragmentos de DNA que se desea resolver) en buffer 1x TBE (10x: 1 M Tris, 1M ácido bórico, 20 mM EDTA) y H<sub>2</sub>O hasta el volumen deseado. Se siembran 7 a 10 ug del DNA digerido por calle del gel. La electroforesis submarina se realiza a 25 volts en presencia de buffer TBE 1x durante 20-24 hs para un gel de 12 x 20 cm de tamaño. En paralelo se siembra en el mismo gel 100 ng de marcadores de tamaño

molecular (M1, M2 o lambda/Hind III). Estos generan los siguientes fragmentos:

-M1: DNA de fago lambda digerido individualmente con HindIII y SmaI (fragmentos de 23.1, 19.4, 12.2, 9.4, 8.6, 8.3, 6.6, 4.45, 2.3, 2 kb).

-M2: DNA de fago lambda digerido con KpnI y BstEII por separado (fragmentos de 29.2, 17, 8.4, 7.2, 6.4, 5.7, 4.8, 4.5, 3.7, 2.4, 1.9, 1.5, 1.4, 1.3 kb)

-Lambda HindIII: 23, 9.4, 6.6, 4.2, 2.3, 2 y 0.5 kb.

Se siembran estos marcadores de tamaño molecular, los cuales se detectan posteriormente por hibridización con una sonda de DNA de fago lambda radiactiva.

Luego de la corrida electroforética, se incuba el gel en 0.15 M HCl por 10 min, se lava con H<sub>2</sub>O y se lo incuba 30 min en 0.4N NaOH. En paralelo se humedece en H<sub>2</sub>O destilada la membrana de nylon (Biotrace RP, Gelman) sobre la cual se transferirá el DNA.

El sistema de transferencia incluye desde la base hasta la parte superior: una placa de vidrio apoyada sobre los extremos de una bandeja de plástico conteniendo 0.4N NaOH, un puente de papel Whatman 3 MM cuyos extremos se encuentran embebidos en la cuba con NaOH, el gel, la membrana de nylon, 2 papeles Whatmann cuyos extremos no sobrepasen los límites de la membrana, 10 cm de servilletas de papel y una placa de vidrio y 0.5 kg de peso. Se realiza la transferencia o/n. Luego de la misma, se desmonta la estructura y se lavan los restos de agarosa pegados a la membrana con 2xSSPE (30x: 5.4M NaCl, 0.3 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 30 mM EDTA) durante 10 min. Se seca la membrana al aire.

#### HIBRIDIZACION CON SONDAS RADIATIVAS

A) Marcación de la sonda: se realizó por el método de Random multipriming (Feinberg 1984):

Se mezclan 25 ng de la sonda (inserto purificado) con 250 pg de DNA de fago lambda. Se hierve 2 min. Se incuba en hielo 5 min. Se agrega 5 ul de 5x OLB (\*), 8.7 ul de H<sub>2</sub>O, 4 ul de  $\alpha$ P32 dCTP 10 uCi/ul (actividad específica de más de 3000 ci/mMol). Finalmente se agregan 2.5 U de Klenow y se incuba desde 3 hs a o/n a temperatura ambiente. Se eliminan los nucleótidos no incorporados pasando la muestra por una columna de Sephadex G200 o Elutip (S & S).

\*5x OLB:

-Solución "O": 1.25 M Tris pH8, 0.125 M MgCl<sub>2</sub>.

-Solución "A": 1 ml de solución "O", 18 ul b<sub>2</sub>-mercaptoetanol 3 M, 5 ul de cada dinucleótido trifosfato (dATP, dTTP, dGTP) previamente disuelto hasta 0.1 M en 3 mM Tris pH 7, 0.2 mM EDTA .

-Solución "B": 2 M Hepes pH 6.6.

-Solución "C": Hexadeoxinucleótidos (Pharmacia: pd(N)6, 50 unidades) suspendidos en 3 mM Tris pH 7, 0.2 mM EDTA a 90 OD unidades/ml.

La solución 5x OLB se obtiene mezclando las soluciones A:B:C en la proporción 100:250:150.

B) **Sondas utilizadas:** La siguiente Tabla resume las características de las sondas utilizadas. En todos los casos se utilizaron los insertos purificados.

Características de las sondas moleculares utilizadas.

Nombre	Referencia	Vector	Antibiótico	Sitio	Tamaño (bp)
Clase I	Sood y col, 1981.	PSP65	Amp	PstI	1400
DRB	Long y col, 1983.	PBR322	Tet	HindIII Sal I	786
DQB	Sheldon y col, 1986.	M13-mp10	-	EcoRI	400+800
DQA	Auffray y col, 1987.	PUC9	Amp	BamHI HindIII	1600
DOB	Tonelle y col, 1985.	PUC12	Amp	BamHI	1400
DNA(DZA)	Trowsdale y col, 1985.	pAT153	Amp	PstI	1600
DPB	Roux y col, 1983.	PUC13	Amp	EcoRI HindIII	1000
DPA	Erlich y col, 1984.	PBR328	Amp	EcoRI	1450
C4	Belt y col, 1984.	pAT153	Amp	BamHI KpnI	500
21-OH	White y col, 1986.	PBR322	Amp	BamHI	1700
C2	Bentley y col, 1985.	pAT153	Amp	KpnI BamHI	350
BF	Morley y col, 1984.	pAT153	Amp	ClaI BamHI	1600+660

### C) Hibridización y lavados:

Se prehibridiza la membrana en una bolsa plástica con una solución que contiene 50 % formamida, 0.1% Denhardt (0.1% Ficoll, 0.1% seroalbúmina bovina, 0.1% polivinil pirrolidona), 5x SSPE, 5% Dextran sulfato, 1% SDS, 200 ug/ml de DNA de esperma de salmón desnaturalizado. Luego de prehibridizar durante 4 hs o más a 42C, se agrega a la bolsa la sonda marcada radiactivamente desnaturalizada 10 min a 100C. La hibridización se realiza durante 20-24 hs a 42C.

Se lava la membrana 2 veces de 5 min cada una, con 2xSSPE a temperatura ambiente, 1 vez 15 min con 2x SSPE, 0.5% SDS a 65C, 1 vez 15 min con 0.5x SSPE a 65C. Se deja secar la membrana al aire y se la expone a una placa radiográfica X-OMAT-AR (Kodak) en un chasis con pantallas amplificadoras, durante 2 a 6 días a -70C.

Cuando una misma membrana se desea rehibridizar a otras sondas, se procede a lavarla con una solución de 0.4 N NaOH por 30 min a 42C y luego en 0.2 M Tris pH 7.5, 0.5% SDS, 0.1x SSPE por 30min a 42C. Luego se la prehibridiza e hibridiza como se indicó antes.

### PURIFICACION DE RNA A PARTIR DE LINFOCITOS DE SANGRE PERIFERICA

Se realizó por la técnica de Chomczynski y Sacchi (1987).

Preparación de los linfocitos: se diluye la sangre en medio con PBS y se la centrifuga sobre un colchón de Ficoll-Hypaque durante 20 min a 1300 g. La interfase de linfocitos se lava dos veces con PBS. A un pellet de linfocitos de sangre periférica (aprox. 20 millones de células), se agrega 1.2 ml de solución D (2 M acetato de sodio pH=4, fenol-cloroformo 1:0.2) y se incuba 10min a temperatura ambiente. Luego se agrega 120 ul de 2 M acetato de sodio pH=4, 1.2 ml de fenol saturado en agua y 240 ul de cloroformo. Se agita 10 a 15 seg. Se centrifuga 10 min a 10000 rpm. Se recuperar la fase superior y se la precipita con un volumen de isopropanol. Al pellet se le agrega 200 ul de solución D y se la solubiliza 15 min. Se precipita con un volumen de isopropanol. Se lava

el pellet con etanol 70% y se resuspende el pellet en 25 ul de 10 mM Tris, 0.1 mM EDTA. Se evalúa la integridad mediante electroforesis en geles de agarosa y se cuantifica por espectrofotometría a 260 nm.

#### SINTESIS DE cDNA

A 1 ug de RNA se le agregan: 1 ul de 0.1 M DTT, 10 ul de 10x buffer (0.5 M KCl, 0.1 M Tris pH=8, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% de gelatina), 16 ul de mezcla de dNTP (1.25 mM de cada uno), 20 uM de cada primer (los primers 5' y 3' son los oligonucleótidos sintéticos utilizados para la amplificación de los genes DQ beta DR beta y DQ alfa descritos en la sección Resultados), 8 U de inhibidor de RNAsa (Amersham), 10 U de transcriptasa reversa (MMLV, BRL), agua hasta completar los 100 ul. Se incuba a 37 C por 1 h.

#### AMPLIFICACION ENZIMATICA DEL DNA (PCR)

Las reacciones se realizan en tubos Eppendorff de 0.5 ml. Para la amplificación del DNA genómico se usan 0.5 a 1 ug de DNA en un volumen final de 100 ul.

-DNA	0.5 a 1 ug
-10x Buffer PCR *	10 ul
-10x dNTP **	10 ul
-PRIMERS	5 pmoles de c/primer
-Taq DNA polimerasa	2 unidades
-H <sub>2</sub> O destilada	hasta 100 ul

\*: 100 mM Tris pH 8.3, 500 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% P/V gelatina.

\*\* : 1.25 mM de cada dNTP.

La reacción de amplificación se realiza en un bloque térmico con variación de temperatura programable. Las condiciones de amplificación

para cada uno de los genes fueron las siguientes:

- Se desnaturaliza el DNA durante 5 min a 95C.
- Se incuba la muestra sucesivamente a 94C por 1 min, a 42-50C (dependiendo de los primers) por 1 min (annealing) y a 72C por 1-2 min (extensión). Se repiten estos pasos de incubación por 30 veces.
- Se incuban las muestras a 72C por 5 min, para completar el último paso de extensión luego del último ciclo.

Luego de la reacción de amplificación, se toma una alícuota de 5 ul de la muestra y se la analiza por electroforesis en gel de 2% agarosa con bromuro de etidio (0.5 ug/ml) para controlar la correcta amplificación del DNA.

Los "primers" o iniciadores utilizados para la amplificación a partir de DNA genómico fueron los siguientes:

DQa:

- primer 3': es una modificación del primer GH27 (29 Scharf 1988) al cual se le modificaron algunas bases para crear un sitio EcoRI.

-----

5'GACACATAgaaATTcGTAGCAGCGGTAGAGTTGG3' (aminoácido 80 al 90).

- primer 5': modificación con sitio EcoRI del primer GH26 (29 Scharf 1988).

-----

5'CACGTTGCgaaTTcGGTGTAAACTTGTACCAG3' (aa 7 a 17).

DQb:

- primer 3': modificación del primer AMPDQb7 (28 Todd 1987) con sitio EcoRI y extensión hacia 5'.

-----  
5'GTCACTGAGaAttCCAGCAGGTTGTGGTGGTTGAGGGCCTC3' (aa 77 a 90)

-primer 5': modificación del primer LPDQ $\beta$ 3 (28 Todd 1987).

-----  
5'ACCTTGaATTTCGATGCTGAGCACCCAGTGGCTGAGGG3' (aa 3 al 16)

DRB:

-primer 5': modificación para generar un sitio EcoRI en la zona conservada en la mayoría de los alelos DR entre los aminoácidos 13 al 25 (Todd 1987).

-----  
5'TGAGTGTgAaTTCTTCAATGGGACGGAGCGGGTGC3'

-primer 3': modificación del primer GAMPDR $\beta$ 1 (28 Todd 1987).

-----  
5'CGCCGCGCTgAatTCGCCGCTGCACTGTGAAGCTCTCTC3' (aa 82 al 94).

Para la amplificación a partir de cDNA se utilizaron los siguientes "primers":

-DQ $\beta$ : los mismos utilizados para la amplificación a partir de DNA genómico.

-DQ $\alpha$ : Son modificaciones de los primers LPDQA y AMPDQA (28 Todd 1987) para insertar un sitio EcoRI.

primer 5': 5'TGCTGCCTGaatTCGCCCTGACCACCGTGATGAGCCC3'  
(posición -10 a 2)

-----  
primer 3': 5'GTCACTGAgAaTTCAGCAGGTTGTGGTGGTTGAGGGCCTC3'  
(posición 147 a 159)

-DR $\beta$ : Son modificaciones de los primers DRBLP1 y DRBAMP1 (28 Todd 1987) para la inserción de un sitio EcoRI.

-----  
primer 5': 5'GTCCTGTCgAAAtTCTCCAGCATGGTGTGTCTGAAGCTCCC3'  
(posición -29 a -17)

-----  
primer 3': 5'CTTAGGATgaattcGCCGCTGCACTGTGAAGCTCTC3'  
(posición 87 a 98)

#### TIPIFICACION DEL DNA AMPLIFICADO POR HIBRIDIZACION CON OLIGONUCLEOTIDOS ESPECIFICOS

##### A) Siembra del DNA amplificado en soportes sólidos ("dot blot"):

La concentración del DNA amplificado debe ser monitoreada por electroforesis en gel, a fin de sembrar cantidades iguales de DNA por spot en la membrana de nylon (Biotrace RP, Gelman Science). Se moja la membrana de nylon en H<sub>2</sub>O destilada. Luego se la incuba 15 min en 10x SSPE. Se seca el filtro a 60°C. Se siembra sobre la membrana 1 a 2  $\mu$ l (20-25 ng) del DNA amplificado. Se seca el filtro a temperatura ambiente. Se incuba el filtro en 0.4 N NaOH por 5 min y luego por 10 min en 10x SSPE. Se seca el filtro a 80°C por 1 h.

##### B) Marcación de los oligonucleótidos en 5' con 32P:

-Mezclar: Oligonucleótido 10 pmol  
10x buffer kinasa \* 2.5 ul  
32P gama ATP (+4000Ci/mmol) 60 a 100 uCi  
T4 Polinucleótido kinasa 2 unidades  
dH2O hasta 25 ul de volúmen final.

\*10x buffer kinasa: 0.5 M Tris pH 7.6, 0.1 M MgCl<sub>2</sub>, 50 mM DTT.

Se incuba por 30 min a 37C. Se detiene la reacción agregando 1 ul de 0.5 M EDTA pH 8. No se purifica el producto marcado, ya que los nucleótidos libres no incorporados no afectan la hibridización.

### C) Hibridización y lavados:

Se preincuba la membrana al menos por 1 h a 42C en 10 ml de solución de hibridización ( 6x SSPE, 5x Denhardt, 0.5% SDS, 100 ug/ml de DNA de esperma de salmón desnaturalizado). Se agrega el oligonucleótido marcado y se incuba a 42C de 2 a 16 hs. Se realizan luego 2 lavados de 10 min a temperatura ambiente en 100 ml de 2x SSPE, 0.1% SDS. Luego se lavan 2 veces (10 min cada) con 100 ml de 6x SSPE, 1% SDS a la Td ( se calcula según la siguiente fórmula:  $Td = 4 \times (\text{número de GC en el SSO}) + 2 \times (\text{número de AT en el SSO})$ ). Se expone a una película Kodak XAR-5 durante 1 a 5 hs. En caso de ser necesaria la rehibridización, se procede de la misma forma que para las membranas descriptas por la técnica del Southern.

Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo fueron los siguientes:

No.	SECUENCIA	CODONES	CADENA QUE RECONOCE
234	5'CGTGCGTTATGTGACCA3'	23-29	DQB1 0301
233	5'GCTGGGGCTGCCTGCC3'	52-58	DQB1 0302
242	5'TGTTTGCCTGTTCTCAGAC3'	47-53	DQA1 0501
238	5'GGCGGCCTGTTGCCGAG3'	54-59	DQB1 0501
2302	5'GACCGAGCGCGTGCGGGG3'	22-27	DQB1 0402
3702	5'AGGAGGACGTGCGCTTCG3'	36-40	DQB1 0601
5707	5'GGCCGCCTGCCGCCGAGT3'	53-59	DQB1 0302

### PURIFICACION Y SUBCLONADO DEL DNA AMPLIFICADO POR PCR

#### a) Purificación del producto de amplificación por PCR:

Se toma la mitad del volumen amplificado por PCR (50 ul) y se le agrega igual volumen de H<sub>2</sub>O. Se extrae con un volumen de cloroformo. Se centrifuga 5 min a 10000rpm y se recupera la fase acuosa. Se agrega 7.5 M acetato de amonio hasta una concentración final 3.7 M y 3 volúmenes de isopropanol. Luego de incubar 20 min a temperatura ambiente se centrifuga 2 min a 10000 rpm. Se recupera el pellet y se lo lava 2 veces con etanol 70%. Se seca bajo vacío y se resuspende en 8 ul de 10 mM Tris pH 7.5. Para aquellas situaciones en que los primers contienen sitios reconocibles por enzimas de restricción, se agrega 1 ul de 10x buffer de digestión y 5U de la enzima. Se incuba a la temperatura óptima de digestión durante 1 h. La digestión enzimática se detiene con 5x buffer de siembra hasta concentración final 1x. Se prepara un minigel de 2% agarosa ultrapura (GTG, F.M.corp) y se siembra el DNA junto con un marcador de tamaño molecular (multímeros de 123 bp, BRL). Se corre el gel a 50 volts por 90 min en buffer TBE 1x. Luego de teñir el gel con bromuro de etidio, se aísla el fragmento de DNA que ha migrado a la distancia correspondiente al tamaño del producto amplificado. Bajo luz

UV se hace una insición justo frente (delante) a la banda a ser purificada. Se inserta en la incisión un trozo de membrana NA45 (Scheleicher and Schull) humedecido en buffer de electroforesis. Se continúa la corrida por 20 min a 50 volts. Se retira el papel conteniendo el fragmento y se lo lava 3 veces con 1 ml de H<sub>2</sub>O en un tubo Eppendorf. Se lo lava luego una vez con 1 ml de buffer NET baja sal (0.15 M NaCl, 0.1 mM EDTA, 20 mM Tris pH 8), se descarta el NET y se agrega 300 ul de NET alta sal (1M NaCl, 0.1 mM EDTA, 20 mM Tris pH 8). Se incuba 20 min a 65 C. Se recupera el buffer de elución y se lo transfiere a un Eppendorf nuevo.

Se agrega como "carrier" 1 ul de RNA de levadura (10 mg/ml), y se extrae: 1 vez con fenol, 1 vez con fenol-cloroformo y 1 vez con cloroformo. Se precipita con 2.5 vol de etanol durante 30 min a -20 C. Se centrifuga, se descarta el sobrenadante, se disuelve el pellet en 180 ul de H<sub>2</sub>O, se agregan 20 ul de 3 M Acetato de sodio y se precipita con 2 vol de etanol. Luego de 30 min a -20C, se centrifuga 30 min a 10000 rpm, se lava el pellet con etanol 70%, se lo seca bajo vacío y se lo disuelve en 10 ul de 10 mM Tris pH 8.

#### **b) Ligado del DNA al vector:**

Se liga el fragmento purificado a un plásmido pUC13 previamente digerido con la enzima apropiada y defosforilado con BAP. Para ello se toman 5 ul de DNA purificado, se agregan 100 ng de vector, 1 ul de buffer 10x ligasa (0.6 M Tris pH 7.6, 70 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 M DTT), H<sub>2</sub>O hasta 9.5 ul y 1 unidad de T4 ligasa. Se incuba 3 hs. a T amb. o 18 hs a 15C.

#### **c) Preparación y transformación de bacterias competentes con el vector recombinante:**

Se realizó según el método de Hannahan (1985). Se utilizó la cepa DH5a que permite una eficiente replicación del plásmido pUC así como la selección por color de las colonias recombinantes en medio conteniendo IPTG y X-Gal.

#### **1) Soluciones:**

TpbI: 30 mM KAc, 100mM KCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 50 mM MnCl<sub>2</sub>, 15% glicerol. Ajustar pH a 5.8 con 0.2M ac. acético.

TpbII: 10 mM MOPS, 75 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 15% glicerol. Ajustar pH a 6.5 con KOH.

## 2) Células:

Se toma una colonia de DH5 a partir de un cultivo en placa de LB agar y se inocula en 5 ml de LB. El cultivo se crece a 37C hasta OD<sub>600</sub>= 0.3. Se subcultivan 1:20 en 100 ml de LB y se las deja crecer a 37C hasta OD<sub>600</sub>= 0.48. Se incuban 5 min en hielo y centrifugan 5 min a 1500 rpm. Se resuspende el pellet en 40 ml de TpbI y se incuba en hielo 5 min. Se centrifuga 5 min a 1500 rpm. Se resuspende el pellet en 4 ml de TpbII y se incuba 15 min en hielo. Las células se guardan en pequeñas alícuotas (100 ul) en tubos Eppendorf y se almacenan a -70C hasta su uso.

## 3) Transformación:

Se diluye el DNA ligado a 50 ul con 10 mM Tris pH 8 y se usan 5 ul para transformar bacterias DH5α competentes. Para la selección de colonias se utilizan placas de agar LB con ampicilina 100 ug/ml. Se descongelan las células a T ambiente, se agrega el DNA (hasta 2/5 del vol de las células y no más de 25 ng del DNA) y se incuban 30 min en hielo. Luego se incuban 90 segundos a 42 C y 2 min en hielo nuevamente. Se agregan 200 ul de LB y 2 ul 0.1 M IPTG y se incuban 1 h a 37 C. Luego de agregar 20 ul de X-gal al 2% (en dimetilformamida) se siembra todo el volumen en una placa de LB agar más ampicilina. Se deja crecer o/n a 37C. Al día siguiente se seleccionan las colonias blancas y se las replica con escarbadiantes en posiciones idénticas a dos placas con LB agar ampicilina, las cuales portan en su superficie un filtro de nitrocelulosa. Se deja crecer o/n a 37C. Se replican también colonias azules, como control negativo de hibridización.

## Rastreo e identificación de las colonias portadoras de inserto:

El filtro que posee las colonias crecidas se procesa para hibridización con sondas radiactivas. Para ello se lo coloca sobre: un secante embebido en 10% SDS durante 3 min; un secante embebido en 0.5 M NaOH, 1.5M NaCl durante 5 min; un secante embebido en 0.5 M Tris pH 8, 1.5 M NaCl durante 5 min; finalmente se lo sumerge en 2x SSPE; se seca a T amb 30 min y hornea a 80C por 2 hs.

Se hibridiza con la sonda apropiada a 60C o/n en medio acuoso conteniendo 10x Denhardt, 6x SSPE, 0.2% SDS, 100 ug/ml DNA de esperma de salmón. Se lava a 60C con 2x SSPE, 0.2% SDS. El filtro se expone 2-18 hs y se detectan por radiografía las colonias positivas. Las mismas se repican a partir de la placa de Petri duplicado para su crecimiento y posterior extracción de plásmido en medio líquido (LB+amp).

## EXTRACCION DE LOS PLASMIDOS RECOMBINANTES.

Se utilizó el método de Birnboim y Doli modificado según Maniatis (1982).

Se replica una colonia bacteriana a 5 ml de medio LB con ampicilina y se cultiva o/n con agitación rotatoria. Se centrifuga el cultivo durante 5 min a 4000 rpm y se descarta el sobrenadante. Se agregan 90 ul de solución 25 mM Tris pH 8, 10 mM EDTA, 50 mM glucosa. Se transfiere a un tubo Eppendorf y se agregan 10 ul de lisozima 50 mg/ml preparada en la solución anterior. Se incuba 5min a T amb. Se agregan 200 ul de 0.2 N NaOH, 1% SDS. Se agregan 150 ul de 3 M acetato de sodio y se incuba en hielo 15 min. Se centrifuga 10 min a 14000 rpm. Se recupera el sobrenadante y se extrae una vez con fenol-cloroformo. Se recupera la fase acuosa y se precipita con 2 vol de etanol durante 5 min a T amb. Se centrifuga 10 min a 14000 rpm y se descarta el sobrenadante. Se disuelve el pellet en 100 ul de TE (10 mM Tris pH 8, 1 mM EDTA). Se agregan 2.5 ul de 10mg/ml RNAsa durante 10 min a T amb. Se agregan 80 ul de H<sub>2</sub>O, 20 ul de 3 M acetato de sodio pH 5 y se extrae 1 vez con fenol y 1 vez con cloroformo. Se recupera la fase acuosa y se precipita con 2 vol de etanol. Se lava el pellet con etanol 70% y luego de secar en vacío, se resuspende en 20 ul de 10 mM Tris pH 8.

## DETERMINACION DE LA SECUENCIA NUCLEOTIDICA DEL DNA AMPLIFICADO.

Se realizó por la técnica de Sanger sobre DNA plasmídico bicatenario. Para ello se utilizó un kit comercial (Sequenase 2.0, USB corp.) y "primers" sintéticos que permiten iniciar la síntesis a ambos lados del sitio clonado y secuenciar ambas cadenas del DNA del inserto.

a) "Annealing" del primer al templado: se mezclan 4 ug de templado con H<sub>2</sub>O hasta un vol de 8 ul. Se agregan 2 ul de 2N NaOH y se incuba 5 min a T amb. Se agregan 0.5 pmoles de primer, 3 ul de 3 M acetato de sodio pH 5 y 9 ul de H<sub>2</sub>O. Se precipita con 75 ul de etanol y se incuba 30 min a -70 C. Se centrifuga 5 min a 10000 rpm, se descarta el sobrenadante y se lava el pellet 2 veces con etanol 70%. Se seca al vacío y resuspende en 10 ul de buffer 1x ( 200 mM Tris pH 7.5, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 250 mM NaCl). La reacción de secuenciación se realizó según las instrucciones del fabricante del kit.

b) Marcación: se diluye la mezcla de marcación (7.5 uM dGTP, 7.5 uM dCTP, 7.5 uM dTTP) 5 veces con H<sub>2</sub>O. Se diluye la enzima secuenasa 1:8 en 10 mM Tris, 1 mM EDTA. Se mezclan: 10 ul de mezcla de annealing, 2 ul de la mezcla de marcación diluida, 10 uCi de ( $\alpha$ 32P) o ( $\alpha$ 35S) dATP 1000 Ci/mmol, 1 ul de secuenasa diluida. Se incuba 5 min a T amb.

c) Terminación: se rotulan 4 tubos G, A, T, C. Se agrega a c/u 2.5 ul del dideoxinucleótido correspondiente. Se precalientan 2 min a 37 C. Se agrega a c/u 3.5 ul de la marcación hecha en el punto anterior. Se incuban 5 min a 37C. Se finaliza la reacción con 4 ul de buffer de siembra ( 95% formamida, 20 mM EDTA, 0.05% Bromofenol Blue, 0.05% xilene Cyanol FF). Se mantienen en hielo hasta la siembra. Antes de sembrar, las muestras se calientan 2 min a 75 C.

d) Gel de poliacrilamida: se prepara un gel al 6% poliacrilamida ( 15 ml solución 38% acrilamida/ 2% bisacrilamida, 50 g de urea, 10 ml 10x TBE, 45 ml H<sub>2</sub>O). Se induce la polimerización con el agregado de 1 ml de persulfato de amonio al 10% p/v y 10 ul de TEMED. El gel se arma entre 2 vidrios de 33 x 40 y 33 x 43 cm respectivamente. Luego de la polimerización, se coloca el gel en una cuba de electroforesis modelo S2

(BRL) con buffer TBE 1x.

•) **Electroforesis:** Se realiza a 1500 volts, 30-45 mA y 50 watts. De cada muestra se realizan 2 descargas: una que migra 5 hs, y una corta de 2 hs. El orden de siembra de cada nucleótido es G, A, T, C. Luego de la corrida se fija el gel en 10% metanol/10% ac.acético durante 20 min y se lo seca bajo en vacío durante el tiempo que sea necesario. Los resultados se obtienen por exposición autoradiográfica.

# RESULTADOS

## ESTUDIO DEL POLIMORFISMO GENOMICO DE LAS MOLECULAS DE HISTOCOMPATIBILIDAD DE CLASE II.

Por medio de la técnica de Southern (1975) es posible analizar fragmentos en el DNA celular humano obtenidos por digestión con endonucleasas de restricción. Con esta técnica se pudo demostrar un complejo patrón de fragmentos de restricción que hibridizan con sondas moleculares clonadas de los genes HLA de clase I y clase II (Cohen 1987). A los fragmentos que se encuentran en ciertos individuos y no en otros, se los denominó alo genotipos. Se ha encontrado correlación de ciertos alo genotipos con ciertos alelos del sistema HLA definidos por la serología clásica (Kohonen-Corish, 1986). También se han podido definir variantes polimórficas (RFLP) no distinguibles por técnicas serológicas clásicas (Chertkoff, 1988). Estos estudios preliminares se limitaron a analizar muestras de unos pocos individuos, mediante el uso de unas pocas nucleasas de restricción. El hecho que los distintos laboratorios utilizaran sondas diferentes (cDNA, genómicas, de distintas longitudes, etc) y muestras de individuos de variados orígenes étnicos, limitó enormemente la posibilidad de comparar los resultados obtenidos y generalizar las conclusiones. Resultó entonces obvio hacia 1987 la necesidad de realizar estos estudios de Southern en un gran número de individuos que en su conjunto representen todas las variantes de los alelos HLA de clase I (más de 70) y clase II (más de 30), analizados con una variada gama de endonucleasas de restricción para aumentar las posibilidades de hallar fragmentos propios de cada alelo. Finalmente, este estudio debía incluir también individuos portadores de idénticos alelos HLA, pero pertenecientes a distintos grupos étnicos. De esta forma, cualquier estudio molecular del sistema HLA podía ser encarado conociendo todas las posibles variantes alelicas descritas en las distintas poblaciones. Por otro lado, estudios pioneros en este tema (Cohen 1984, Nepom 1986) demostraron la presencia de ciertos RFLPs en patologías asociadas al HLA. Por ejemplo: en la diabetes tipo I insulino dependiente nepom y col. hallaron una banda de 12 kb/BamHI detectada con la sonda DQB presente en más del 90% de los pacientes portadores del alelo HLA-DR4 (Nepom 1986), mientras que una banda EcoRI de 2.2 kb presente en la mayoría de los individuos portadores del alelo HLA-DR2 en la población normal, se halla ausente en los pacientes diabéticos HLA-

DR2 (Cohen 1984). Estas observaciones motivaron enormemente la necesidad de extender los estudios de RFLP de los genes HLA.

Un proyecto de semejante magnitud sólo podía ser realizado en forma colaborativa internacional, en el marco de los clásicos Talleres (Workshop) Internacionales de Histocompatibilidad. Fue así que los organizadores del X Workshop Internacional de Histocompatibilidad (XWIH 1987) decidieron incluir en el mismo estudios de polimorfismo genómico como complemento al análisis tradicional de las moléculas HLA por serología, bioquímica, cultivo mixto linfocitario y citotoxicidad.

Es así como 58 laboratorios de todo el mundo participaron colaborativamente en este programa. Para el mismo, los organizadores han provisto a todos los laboratorios participantes protocolos estandarizados para la extracción de DNA genómico, digestión con enzimas de restricción, electroforesis en geles de agarosa, Southern blotting e hibridización con sondas moleculares radiactivas. Asimismo, los organizadores proveyeron de las 13 sondas moleculares HLA de clase I, II y III con las cuales se realizaron todos los estudios en condiciones comparables por todos los laboratorios participantes.

Los objetivos amplios de estos estudios genómicos comprendieron el:

- a) Análisis de 72 líneas celulares homocigotas a nivel del HLA.
- b) Análisis de familias locales.
- c) Análisis de genotipos recombinantes.

El objetivo amplio de este trabajo de tesis fue conocer las bases moleculares de la asociación entre la enfermedad celíaca pediátrica y el sistema HLA. La posibilidad de participar en el XWIH nos permitió no solo conocer los patrones de RFLP presentes en individuos normales, sino también disponer de las condiciones experimentales (incluyendo las sondas necesarias) para lograr una comparación válida de nuestros resultados obtenidos en pacientes. Describiremos a continuación los resultados generados en nuestro laboratorio para este Taller Internacional, su análisis local y centralizado y las conclusiones

generales obtenidas.

**a) Análisis de líneas celulares:**

Se estudiaron 72 líneas celulares homocigotas a nivel del HLA que cubren las variantes alélicas serológicamente definidas desde HLA-DR1 al DR8 (Tabla 4). Se usaron 12 enzimas de restricción distintas (EcoRI, MspI, BamHI, PvuII, BglII, HindIII, RsaI, TaqI, PstI, EcoRV, KpnI y SstI) con las 13 sondas HLA de clase I, II y III (DRA, DQA, DPA, DQB, DRB, DOB, DPB, clase I, C2, BF, 210H, C4 y ). Esto hace  $12 \times 13 = 156$  combinaciones enzima/sonda para cada célula. El objeto de este estudio fue definir un tamaño molecular de referencia para cada fragmento de DNA, necesario para toda evaluación futura del polimorfismo que exhiben estos genes. Cada laboratorio participante usó una sola enzima (en nuestro caso BglII) sobre las 72 líneas celulares y 9 sondas diferentes (en nuestro caso: DRB, DQB, DPB, DQA, clase I, C2, Bf, C4 y 210H) (ver Materiales y Métodos).

Se digirió el DNA de las 72 líneas con la enzima BglII y se sembraron 7 ug de DNA por calle junto con marcadores de tamaño molecular M1 y M2 según el siguiente orden:

- gel A: M1 M2 muestras 1 a 24 M1 M2
- gel B: M1 M2 muestras 25 a 48 M1 M2
- gel C: M1 M2 muestras 49 a 72 M1 M2

Esto es, cada gel incluyó 24 muestras y en ambos costados los marcadores de tamaño molecular. Para la resolución de los fragmentos largos, se sembraron los DNA en geles de 0.6% agarosa, la corrida se realizó a 40 volts durante 40 hs. Para la resolución de los fragmentos cortos, se sembraron las muestras en geles de 0.9% agarosa y se los corrió a 25 volts durante 48 hs. Luego de la corrida, se transfirió el DNA a membranas de nylon las cuales fueron tratadas e hibridizadas con las sondas de clase II según los protocolos detallados en los Materiales y Métodos. Para cada sonda se preparó un total de 6 membranas que representan la corridas de las 72 líneas celulares en condiciones "largas" y "cortas".

Tabla 4: Líneas celulares utilizadas para los estudios de RFLP del X Workshop Internacional de Histocompatibilidad.

LINEA	DR	DRw	DQw	LINEA	DR	DRw	DQw
QBL	3	52	2	CB6B	13	52	5
RSH	3	5	4	OMW	13	52	6
L0081785	3	52	2	WT47	13	52	6
WT51	4	53	8	SLE005	13	52	6
BM92	4	53	8	KOSE	13,14	52	5
YAR	4	53	8	AMALA	14	52	7
PE117	4	53	8	31227ABO	14	52	5
LKT3	4	53	4	EK	14	52	5
BM14	4	53	8	TEM	14	52	1
BSM	4	53	8	MOU	7	53	2
SAVC	4	53	8	PLH	7	53	2
DEU	4	53	7	DBB	7	53	9
MLF	4	53	7	PITOUT	7	53	2
BOLETH	4	53	8	MANIKA	7	53	2,3
JHAF	4	53	7	LBUF	7	53	2
DEM	16	53	5	TAB089	8	52	6
JVM	11	52	7	BM9	8	52	4
DHIF	11	52	7	MADURA	8	52	4
BM15	11	52	7	BTB	8	52	4
SPO010	11	52	5	OLGA	8	52	4
SWEIG007	11	52	7	LUY	8	52	7
BM21	11	52	7	SPACH	8	52	4
TISI	11	52	7	DXB	9	53	9
FPAF	11	52	6	KAS116	1		5
TUBO	11,12	52	7	JESTHOM	1		5
BM1G	12	52	7	WT100BIS	1		5
HO301	6	52	6	MZ070782	1		5
WDV	13	52	6	HOM2	1		5
HHKB	13	52	6	KAS011	2		1
MGAR	15		6	DO208915	15		6
SCHU	15		6	HO104	15		6
AMAI	15		6	E418324	15		1
RML	16		7	COX	3	52	2
DUCAF	3	52	2	VAVY	3	52	2
PF04015	3	52	2				

Para el análisis de los fragmentos de restricción obtenidos en cada autorradiograma, se recurrió a programas de computación provistos por el comité organizador del XWIH. La información fue recogida en diskettes de 5 1/4" y remitida para su análisis preliminar conjunto por el comité organizador. Para el análisis, se definió en primer lugar los datos de la migración (en mm) de los fragmentos correspondientes a cada uno de los marcadores de tamaño molecular (M1 y M2) de cada una de las 6 autorradiografías hibridizadas con una sonda dada; estos valores son los mismos con las distintas sondas en la medida en que la misma membrana se hibridiza con varias sondas. Se definieron (en mm) luego, los fragmentos de restricción presentes numerados según un orden creciente de migración correspondientes a los distintos geles y sondas. Se analizó entonces, en cada línea celular (en cada calle) la presencia o ausencia de cada fragmento según el siguiente código:

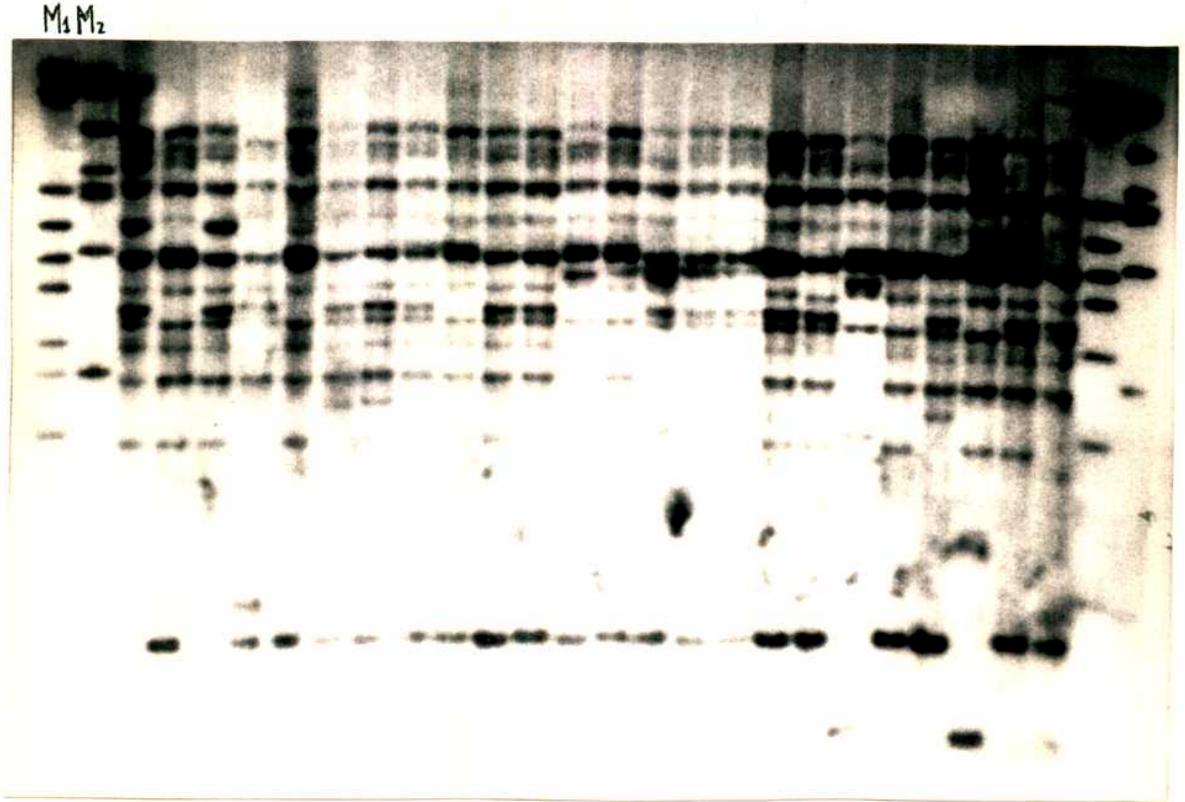
- 1= intensidad de fragmento asignable a simple copia.
- 2= intensidad de fragmento asignable a doble copia.
- 3= intensidad mayor que dos veces asumida como simple.
- 8= fragmento presente de intensidad débil.
- 9= imposibilidad de leer.
- Blanco= fragmento ausente.

La Figura 9 muestra un ejemplo de los resultados con la sonda DPB y la Tabla 5 el registro de las bandas obtenidas.

Luego de la estimación de los parámetros para cada filtro, el programa de computación estimó los tamaños moleculares de los fragmentos experimentales presentes en el filtro correspondiente. Ya que los resultados obtenidos con cada sonda están presentes en 6 membranas, para la mayor parte de los fragmentos de restricción presentes en las células existen hasta 6 estimaciones de peso molecular, las cuales fueron utilizadas para una estimación final promedio obtenida de los 6 filtros. El análisis centralizado permitió definir para cada enzima:

- a) la correlación fragmento/sonda (ver ej. Tabla 6)
- b) la correlación entre la tipificación serológica de cada línea celular con el tamaño de cada fragmento para cada sonda (ver ej. en Tabla 7).

Figura 9: Autorradiografía del patrón de fragmentos obtenidos de la hibridización con la sonda DQA. Los fragmentos BglII se resolvieron en un gel 0.9 % agarosa (condiciones cortas). M1 y M2 son marcadores de tamaño molecular (ver materiales y métodos)



**Tabla 5:** Análisis por computación de los fragmentos de restricción.  
a) Distancia recorrida en mm. de los marcadores de peso molecular en las distintas radiografías de las membranas hibridizadas con la sonda DQA.

m1= marcador M1; m2= marcador m2; A= membrana que contiene a las líneas celulares 1 a 24; B= membrana que contiene a las líneas celulares 25 a 48; C= membrana que contiene a las líneas celulares 49 a 72; S = condiciones de corrida electroforética para fragmentos cortos; L= condiciones de electroforesis para fragmentos largos.

b) Numeración de todos los fragmentos de restricción BglII presentes en la hibridización con DQA y la distancia de migración en mm. en las distintas membranas.

c) Análisis del patrón de fragmentos. En la segunda línea se indica el nombre de la sonda utilizada: DQA y de la enzima: BglII. En la tercera y cuarta línea están numeradas las 72 líneas celulares como calles o columnas. Debajo de cada una de ellas se analiza por presencia o ausencia de cada uno de los 14 fragmentos definidos en b) según el código antes mencionado.

a)

Probe Name: DQA		Marker Mobility Enzyme Name: BGLII											
Frag	ASm1	ASm2	BSm1	BSm2	CSm1	CSm2	ALm1	ALm2	BLm1	BLm2	CLm1	CLm2	
1	0	130	0	113	0	121	0	531	0	565	0	490	
2	135	0	130	0	122	0	570	0	605	0	536	0	
3	150	0	150	0	149	0	600	0	650	0	578	0	
4	0	158	0	165	0	155	0	637	0	688	0	615	
5	212	0	224	0	202	0	771	0	835	0	765	0	
6	275	0	290	0	266	0	917	0	998	0	915	0	
7	305	0	324	0	291	0	971	0	1060	0	975	0	
8	0	310	0	332	0	297	0	983	0	1078	0	986	
9	325	0	341	0	308	0	1002	0	1098	0	1005	0	
10	0	370	0	385	0	355	0	1100	0	1208	0	1104	
11	410	0	435	0	400	0	1183	0	1294	0	1180	0	
12	0	425	0	447	0	410	0	1205	0	1320	0	1204	
13	0	478	0	487	0	456	0	1296	0	1422	0	1293	
14	0	568	0	589	0	547	0	1463	0	1605	0	1452	
15	0	615	0	635	0	595	0	1550	0	1700	0	1532	
16	615	0	637	0	600	0	1552	0	1705	0	1535	0	
17	0	715	0	739	0	696	0	1723	0	1895	0	1695	
18	0	985	0	1005	0	970	0	0	0	0	0	0	
19	1000	0	1037	0	985	0	0	0	0	0	0	0	
20	1082	0	1102	0	1070	0	0	0	0	0	0	0	
21	0	1100	0	1119	0	1086	0	0	0	0	0	0	
22	0	1250	0	1275	0	1248	0	0	0	0	0	0	
23	0	1310	0	1327	0	1300	0	0	0	0	0	0	
24	0	1350	0	1375	0	1350	0	0	0	0	0	0	
25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
26	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Page Up = Top

Page Dn = Bottom

Ctrl/E = Exit to Menu

Probe Name: DQA

Fragment Mobility  
Enzyme Name: BGLII

Frag	AS	BS	CS	AL	BL	CL
1	195	190	195	672	720	655
2	218	195	205	710	775	700
3	222	218	216	720	790	705
4	272	270	252	840	935	805
5	290	280	260	915	0	835
6	305	306	300	922	1025	920
7	330	335	320	980	1075	975
8	375	385	365	1080	1190	1070
9	395	410	390	1112	1225	1105
10	440	445	425	1200	1322	1200
11	690	705	675	1670	1840	1645
12	697	720	680	1690	1855	1650
13	960	972	950	2130	0	2050
14	1200	1217	1195	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0
17	0	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0

Page Up = Top

Page Dn = Bottom

Ctrl/E = Exit to Menu

DNA Fragment Presence/Absence in Target Cells

Probe Name: DQA

Enzyme Name: BGLII

00000000011111111122222222223333333333444444444455555555556666666666777

Frag	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18			
1		1	888	2	22		2	8	8	1		2		88	81	8		18			
2	1		2	2	2		1	11		1	2	2		2	21			1	1		
3	2223112121	2	1	22	21		1	2	22	2	2	2222	2222	2222	2	132223822222	2	2	3		
4		88	8	8				88888		888				8	8	8			8		
5			1				88		8	8				8		8					
6	1		1	1	1		1	1	1	11		1	1	1	11	1	1		1		
7			1		1	22		1				2							2		
8	1		1	1	1		1	9		1	1	1	19	1		8		1			
9	111	111111	1	1	1111111		911111	2	2	1	11	91	1	2111111	22	111	111111	1	28		
10	222	2222212222222	22		22912	22231322	22291	22	221222	33	222	22222212							1		
11	2		2		2		1			9	991					1					
12			2	2	2		8	2	1	82	81		319	99	2		1	11	11	8	2
13	2222	222	22		2222	22	2	2	22	1212	922222	22	222222	21	22	122	221291	2			
14	3111	222	11		2221311	3	2	11	2122	912222	12	211112	12	11	121	2222	1	1			
15																					
16																					
17																					
18																					

Page Up = Top

Page Dn = Bottom

Ctrl/E = Exit to Menu





De esta manera, se pudieron definir "clusters" de correlación de determinados fragmentos asociados a determinadas tipificaciones serológicas.

Estos datos fueron posteriormente analizados por investigadores participantes en el Taller de discusión del XWIH llevado a cabo a fines del año 1987 en Princeton (USA). Las conclusiones obtenidas para cada combinación enzima/sonda fueron publicados como "Informes de estandarización de RFLP" en el libro "Histocompatibility Testing, 1987", publicado por Springer Verlag, USA.

Como ya se mencionó antes, nuestro laboratorio realizó estudios con la enzima BglIII sobre las 72 líneas celulares. Discutiremos a continuación los resultados obtenidos con esta enzima para las sondas de clase II.

**b) Patrones RFLP generados por la sonda DQA:**

El sistema DQA/BglIII identificó 8 fragmentos en las líneas celulares (Fig.10). No se encontró ningún fragmento común a todas las líneas. La Tabla 8 indica la distribución de las bandas observadas en las líneas celulares. El análisis de las mismas permitió obtener las siguientes conclusiones:

1) No se halló un fragmento específico que definiera las especificidades DQ. Además, hay patrones de bandas compartidos entre especificidades serológicas distintas. Por ejemplo, la banda 8 es compartida tanto por DQw1 como por DQw3.

2) Para el alelo DQw1 definido por serología se observaron 2 patrones de RFLP diferentes (bandas n=3, 5 y 8). Uno de estos patrones es específico de este alelo. El otro (bandas n=4, 5 y 8) es compartido por todas las células DQw3-DR4.

3) Se hallaron 3 patrones de bandas para la especificidad DQw2. Un patrón específico de bandas es encontrado en las líneas DR7-DQw2 (bandas n=2, 4 y 8) distinto del encontrado en las líneas B8-DR3-DQw2 (bandas n=3, 5 y 7) distinto del encontrado en las líneas B18-DR3-DQw2

**Figura 10:** Autorradiografía de los fragmentos de restricción obtenidos por la digestión del DNA de las líneas celulares con la enzima BglII y la hibridización con una sonda DQA. El patrón de la izquierda corresponde a la electroforesis del gel en condiciones "cortas". El patrón de la derecha fue obtenido luego de la electroforesis en condiciones "largas". Los números enteros indican los 8 fragmentos definidos por este sistema. En la figura se señalan los marcadores de tamaño molecular M1 y M2.

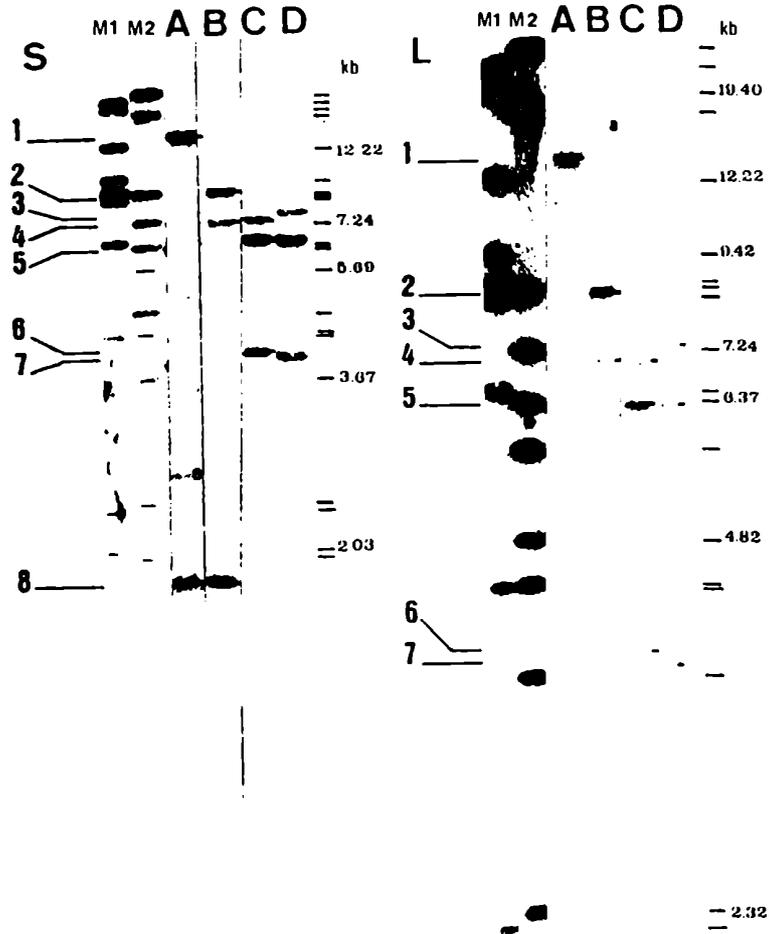


Tabla 8: Distribución de los fragmentos DQA/BglIII hallados por RFLP para las 72 líneas celulares homocigotas.

Líneas	HLA		Fragmentos n=							
	DQw	DR	1	2	3	4	5	6	7	8
9017	1	w15				1	1	2		2
9002	5	1				2		2		2
9054	5	w14				2		2		2
9060	5	w13				2		2		2
9065	6	w13				2		2		2
9055	6	w6				2		2		2
9009	1	2					2	2		2
9036	5	w11					2	2		2
9004	5	1					2	2		2
9003	5	1					2	2		2
9006	5	1					2	2		2
9005	5	1					2	2		2
9061	5	w14					2	2		2
9057	1	w14					2	2		2
9056	5	w13/w14					2	2		2
9063	6	w13					2	2		2
9062	6	w13					2	2		2
9058	6	w13					2	2		2
9082	6	w15					2	2		2
9010	6	w15					2	2		2
9013	6	w15					2	2		2
9014	6	w15					2	2		2
9011	6	w15					2	2		2
9008	6	w15					2	2		2
9105	6	w11					2	2		2
9066	6	w8					2	2		2
9007	5/8	w16/4		2			2	2		2
9048	2	7					2	2		2
9047	2	7			2		2			2
9050	2	7			2		2			2
9051	2	7			2		2			2
9020	2	3a			2		2			2
9019	2	3a			2		2			2
9018	2	3a			1		2	2		2
9088	2	3b				2		2		2
9022	2	3b				2		2		2
9023	2	3b				2		2		2
9106	2?3	7		1		2		2		2
9040	7	w11				2		2		2
9037	7	w11					2	2	2	
9043	7	w11					2	2	2	
9038	7	w12					2	2		2
9039	7	w11					2	2		2
9042	7	w11					2	2		2
9045	7	w11/12					2	2		2
9025	7	4					2	2		2
9091	7	4					2	2		2
9030	7	4					2	2		2
9104	7	w11			8		2	2		2
9028	8	4			2		2	2		2
9026	8	4					2	2		2
9029	8	4						2	2	2
9031	8	4						2	2	2

(continuación)

Líneas	HLA		Fragmentos n=							
	DQw	DR	1	2	3	4	5	6	7	8
9032	8	4					2	2		2
9033	8	4					2	2		2
9034	8	4					2	2		2
9092	8	4					2	2		2
9075	9	w9					2	2		2
9052	9	7	2							2
9071	4	w8	2				2	2		2
9069	4	w8	2							2
9067	4	w8	2							2
9068	4	w8	2							2
9072	4	w8	1							2
9070	7	w8	2							2
9064	7	w14	2							2
9016	7	w16	2						2	
9107	4	4	2							2
9021	4	3			2			2		2

a= DR3-B18

b= DR3-B8

1= intensidad de fragmento asignable a simple copia.

2= intensidad de fragmento asignable a doble copia.

8= fragmento presente de intensidad débil.

(bandas n=2, 4 y 7). De este modo confirmamos en todas las líneas que la cadena DQA en desequilibrio de ligamiento con el alelo DR7 no es la misma que la cadena DQA asociada al alelo DR3.

4) Un solo patrón fue encontrado para DR8-DQw4 (bandas n=1 y 7).

5) Se describieron 3 patrones para DQw3 (bandas 4, 5 y 6; 4, 5 y 7; 4, 5 y 8), el tercero es compartido con la especificidad DQw1.

**c) Análisis para el sistema DQB/BglII:**

Para este sistema se observaron 10 fragmentos standard distintos. Sólo los fragmentos de 4.23 kb y 4.12 kb son específicos para los genes DQB (bandas que no presentan hibridización cruzada con otros genes de clase II). El resto son el resultado de hibridización cruzada con los genes DRB y/o DPB. Con esta enzima se hallaron muy pocas correlaciones entre RFLP y serología. Por ejemplo, el fragmento de 4.12 kb parece estar asociado a la presencia de la especificidad serológica DQw7. Como se discute más adelante, varios alelos DQB, DRB, etc. pueden ser definidos por "clusters" generados con otras enzimas de restricción.

**d) Análisis para el sistema DPB/ BglII:**

Se definieron 18 fragmentos para este sistema. Los fragmentos 1 (20.50 kb), 3 (15.05 kb), 8 (7.28 kb), 10 (6.56 kb), 13 (5.15 kb) y 14 (5.05 kb) son específicos de DPB. La enzima BglII no genera patrones de RFLP que permitan definir alguna de las especificidades HLA-DP.

**e) Análisis para el sistema DRB/BglII:**

Para este sistema se definieron 14 fragmentos diferentes. Los fragmentos 2 (16.70 kb), 3 (14.55 kb), 4 (11.74 kb), 6 (10.27 kb), 5 (11.14 kb), y 7 (9.77 kb) son específicos del locus DR. Los fragmentos 4 y 6 aparecen en la mayoría de las líneas celulares DR4; el 5 en la

mayoría de las líneas DR1 y el 7 en las líneas DR8. El alelo DR2 presenta una banda de 14.55 kb específica con esta enzima (11 líneas DR2).

**f) Análisis del sistema DOB/BglIII:**

Para este sistema se definieron 4 fragmentos, siendo tres de ellos (8.27 kb, 7.70 kb) y 7.37 kb) específicos del locus DOB.

**g) Comentarios:**

Como era de preveer, una enzima no es suficiente herramienta para definir patrones de bandas únicos asociados a las distintas especificidades serológicas de los genes HLA de clase II.

Para el sistema BglIII/DQA hemos observado que, en algunos casos no hay correlación entre el patrón hallado por RFLP y lo esperado por serología. El hecho que los sitios BglIII presentes en el gen DQA (intrones, exones, secuencias flanqueantes, etc) no correlacione con las especificidades DR, DQ definidas por serología, en parte se debe a que estas últimas identifican epitopes presentes en los genes DRB1 y DQB1. Además, un alelo DQB1 dado, no siempre se halla asociado por desequilibrio de ligamiento al mismo alelo DQA (Trucco 1986). También hay patrones de fragmentos compartidos por más de una especificidad serológica (caso de DQw1 y DQw3). Este sistema permitió hallar las primeras diferencias entre las cadenas DQA asociadas al alelo DR3-DQw2 de las asociadas al alelo DR7-DQw2.

Para la definición de los alelos del locus DQB, ha sido imposible definirlos con esta única enzima. Sin embargo se han podido definir "clusters" de fragmentos (producto de la digestión con distintas enzimas) que definen cada una de las especificidades (Trucco 1987). Por ejemplo, la especificidad DQw5 puede ser definida por las siguientes bandas: Pst I/1.36 kb, BamHI/5.76kb, EcoRV/2.71 kb y 2.62 kb, BamHI/3.03 kb, HindIII/3.27 kb, EcoRI/11.52.

Para el locus DPB también se definieron "clusters" de fragmentos que definen las distintas especificidades. Por ejemplo (Hyldig Nielsen

1987): el antígeno HLA-DPw1 puede ser definido por los fragmentos MspI/4.98 kb y HincII/3.41 kb. Lo mismo se observó para los genes DRB (Bignon 1987). Por ejemplo, la especificidad supertípica DRw52a se define por la presencia de los fragmentos EcoRI/9.46 kb y BglIII/9.16 kb.

Ya que no se conocen los productos proteicos del gen DOB, no podemos saber cual es la implicancia de los RFLP hallados con BglII. Estudios de secuencia demostraron que no existen sitios BglII dentro de las zonas codificantes de este gen (Tonelle 1985). Por lo tanto, los polimorfismos encontrados con la sonda DOB y la enzima BglII probablemente reflejan la presencia de polimorfismos en las zonas vecinas al gen o en zonas intrónicas.

#### **h) Conclusiones generales:**

En noviembre de 1987 se realizaron en Princeton N.Y los talleres de discusión del XWIH para el análisis final de los resultados, del cual tuvo participación nuestro laboratorio. Los resultados fueron publicados en el libro "Immunobiology of HLA" publicado por Springer Verlag en 1987, el cual contiene los resultados de los análisis serológicos, bioquímicos, de respuesta celular y genómicos y las correlaciones existentes entre ellos.

Para los antígenos de clase II (DP, DQ y DR) de las líneas celulares estudiadas, se identificaron numerosos fragmentos de restricción alelo-específicos. Por ejemplo, para los genes DQB, DQA y DRB se han descrito 536 fragmentos de los cuales 187 han sido elegidos como RFLP "únicos" para la asignación de las especificidades DQ y DR. Estos patrones de fragmentos han permitido discriminar variantes o "splits" de alelos no distinguibles por serología (ver por ej en la Tabla 9 , las 4 variantes definidas por RFLP para la especificidad supertípica DRw52).

Los resultados descriptos establecen que las especificidades HLA detectadas por serología, pueden ser asociadas a patrones RFLP "discriminatorios" basados en la presencia o ausencia de sitios de restricción para endonucleasas. Esto indica que los fragmentos detectados por la combinación de una o más enzimas usadas en el Workshop detectan diferencias entre células que no han podido ser distinguidas

Tabla 9: Análisis de los grupos supertípicos DRw52 y DRw53. Identificación de los fragmentos de restricción que los definen. Esta tabla fue extraída del libro "Immunobiology of HLA", Nomenclature factors for HLA system (1987).

<p><b>DRW52</b> (DR3, DR5, DRW6, DRW8)</p>	<p>1824 Eco RV 236 Hind III</p>	<p>946 EcoR I 916 Bgl II (DR3, DR5, DRW5)</p>	<p>700 Taq I 592 Pvu II 183 Hind III 608 Taq I 866 Taq I</p>	<p>a1 DRW17; DRW8 a2 DRW12 a3 DRW11 (+DRW18) b DRW8</p>
<p><b>DRW 53</b> (DR4, DR7, DRW9)</p>	<p>428 BamH I 463 BamH I 659 BamH I 1255 EcoR I 410 EcoR I 398 EcoR I 373 EcoR I 717 Hind III 313 Hind III 144 Hind III 176 Msp I 1350 Pvu II 517 Pvu II 388 Pvu II 616 Pvu II 2112 Sst I 1095 Sst I 519 Sst I</p>	<p>DR4</p> <p>DR7</p> <p>DR9</p> <p>- See DR4, DR7, DRW9 for complete data -</p>		

por la tipificación serológica de los productos de los genes. Además de la detección de diferencias dentro de cada locus, el análisis de la presencia de grupos de fragmentos generados en loci separados, revela

patrones de desequilibrio de ligamiento dentro de los haplotipos HLA. De esta forma, la hibridización con sondas moleculares "full length" en la tipificación de RFLP, permite la distinción de células cuyos productos exónicos no son fácilmente distinguibles.

Este Workshop representó el primer esfuerzo conjunto entre laboratorios de todo el mundo tendiente a la caracterización a nivel de DNA del sistema HLA.

Además, los datos obtenidos constituyen un marco de referencia para el estudio de los patrones de RFLP asociados a distintos grupos étnicos.

Como se verá más adelante, las conclusiones generadas por estos estudios de RFLP permitieron analizar la complejidad genómica presente en individuos portadores de patologías asociadas al sistema HLA, como la enfermedad celíaca.

## ESTUDIOS A NIVEL SEROLOGICO DE LA ENFERMEDAD CELIACA EN LA ARGENTINA.

Con el antecedente que la EC se asocia a distintos alelos HLA en los distintos grupos étnicos, estudiamos en primer lugar el fenotipo HLA presente en enfermos celíacos pediátricos argentinos.

Para ello, se seleccionó un grupo de 62 niños argentinos portadores de la EC. Estos pacientes y los controles normales pertenecen a una población homogénea y provienen de la misma área geográfica (provincia de BS.As y Capital Federal). Todos los pacientes son descendientes de al menos 3 generaciones de argentinos, con ancestros españoles, italianos o argentinos. En todos los casos, el diagnóstico de acuerdo al criterio ESPGAN fue hecha en la unidad de Gastroenterología del Hospital de Niños Ramón Gutierrez. Estos niños fueron tipificados para los alelos HLA de clase I y clase II en nuestro laboratorio por la licenciada Etel Palavecino (Palavecino 1990). Los antígenos HLA-A, B y C fueron determinados usando el ensayo de microlinfocitotoxicidad (Terasaki 1985). La tipificación de los alelos HLA-DR y DQ fue llevado a cabo por el test de doble fluorescencia (van Rood 1976). Se usaron sueros anti-HLA provenientes del XWIH.

La Tabla 10 muestra una lista de las especificidades de clase I y II encontradas en la población pediátrica celíaca estudiada aquí. Cuando se la compara con una población similar de controles normales (Tabla 11 a), se ven significativamente incrementados los alelos DR3 y DR7 (DR3: 64.5 % en pacientes y 15.1 % en controles, RR=10.2; DR7: 56.4 % en pacientes y 25.9 % en controles, RR=3.7). El antígeno DQw2, el cual se halla en fuerte desequilibrio de ligamiento con los alelos DR3 y DR7, se lo halló en el 95.3 % de los pacientes y el 40.3 % de los controles, con un riesgo relativo de 29.1; esto confirma al alelo DQw2 como el verdadero marcador genético de predisposición a la EC. Nótese que el alelo DR7 solo se halla presente en pacientes heterocigotas junto a DR3 o a DR5 y pese a que los individuos DR7 son DQw2. Por otro lado, el antígeno DQw1 se halló disminuido significativamente en la población celíaca (3.2% en pacientes y 51.1% en controles RR= 0.03).

Los fenotipos HLA-DR más frecuentes están listados en la Tabla 11 a. Las combinaciones más frecuentemente encontradas son: DR3/7, DR3/5, DR3/x (donde x significa homocigosis para DR3 o la presencia de otro

Tabla 10: Fenotipos HLA de los pacientes celíacos.

Paciente Pt	HLA-A	HLA-B	HLA-C	HLA-DR	HLA-DQ
1	2,24	8,35	4,x	3,7	w2
2	1,x	44,x	7,x	3,7	w2
3	1,x	8,44	x,x	3,7	w2
4	1,3	7,8	7,x	3,7	w2
5	3,24	8,35	4,x	3,7	w2
6	3,31	14,51	x,x	3,7	w2
7	3,28	44,x	x,x	3,4	w2,w3
8	28,x	18,x	x,x	3,8	w2,w3
9	2,28	18,44	x,x	3,x	w2
10	1,3	41,x	4,x	3,1	w2,w1
11	23,24	44,61	4,x	4,7	w2,w3
12	1,24	18,x	5,x	5,7	w2,w3
13	11,23	44,41	x,x	3,7	w2
14	1,x	38,44	x,x	5,7	w2,w3
15	2,x	17,62	3,x	5,7	w2,w3
16	11,29	35,44	4,x	5,7	w2,w3
17	1,30	8,51	x,x	5,7	w2,w3
18	11,29	35,57	4,x	5,7	w2,w3
19	26,31	27,44	4,x	5,7	w2,w3
20	2,30	50,64	6,8	5,7	w2,w3
21	2,x	51,x	x,x	5,7	w2,w3
22	2,28	50,51	6,x	5,7	w2,w3
23	2,28	14,27	2,8	5,7	w2,w3
24	11,23	51,44	4,x	5,7	w2,w3
25	1,32	51,62	3,x	5,7	w2,w3
26	2,3	41,44	4,x	5,7	w2,w3
27	3,28	44,51	4,x	5,7	w2,w3
28	1,29	8,44	x,x	5,7	w2,w3
29	2,25	38,44	7,x	5,7	w2,w3
30	24,30	13,x	x,x	5,7	w2,w3
31	ND	ND	ND	3,5	w2,w3
32	1,2	8,44	x,x	3,7	w2
33	2,30	44,x	5,x	3,7	w2
34	2,31	8,x	x,x	3,7	w2
35	3,11	44,51	x,x	3,7	w2
36	ND	ND	ND	3,7	w2
37	2,26	35,58	4,x	3,7	w2
38	2,3	8,13	6,7	3,7	w2
39	1,x	50,51	6,x	3,7	w2
40	2,x	8,39	7,x	3,5	w2,w3
41	2,26	18,51	5,x	3,5	w2,w3
42	2,x	51,62	4,6	3,4	w2,w3
43	3,31	50,60	3,6	3,4	w2,w3
44	1,31	8,60	1,x	3,4	w2,w3
45	1,11	8,60	3,7	3,8	w2,w3
46	2,30	41,65	8,x	3,8	w2,w3
47	2,28	39,44	2,7	3,8	w2,w3
48	2,x	8,62	3,x	3,8	w2,x
49	ND	ND	ND	3,x	w2
50	1,28	8,44	8,x	3,x	w2
51	ND	ND	ND	3,x	w2
52	1,2	8,18	5,7	3,5	w2,w3
53	1,30	8,50	7,x	3,x	w2
54	3,30	18,35	4,5	3,1	w2,w1
55	1,x	8,35	4,x	3,9	w2,w3

(cont.)

Paciente Pt	HLA-A	HLA-B	HLA-C	HLA-DR	HLA-DQ
56	ND	ND	ND	4,x	w3
57	ND	ND	ND	5,8	w3
58	2,24	62,x	3,4	5,4	w3
59	3,2	18,53	x,x	3,5	w2,w3
60	3,34	35,57	4,6	3,5	w2,w3
61	29,30	14,18	x,x	3,7	w2
62	26,30	8,38	7,x	3,x	w2

ND = no realizado

x = no se halló otra especificidad

alelo no detectado serologicamente) y DR5/7 (Tabla 11b). Si se excluyen del cálculo los pacientes DR3 y DR7, surge una significativa asociación del DR5. Es de interés remarcar que el alelo HLA-DR5 fue encontrado solamente en combinación con DR3 y DR7, excepto en dos pacientes cuya tipificación fue DR5/DR8,DQw3 y DR5 /DR4,DQw3. El incremento del alelo DR5 fue también hallado en la población EC italiana (Morellini 1988) y española (Mearin 1983), pero no en la población sajona (Scholz 1983).

**Tabla 11a:** Frecuencia de los antígenos HLA de clase II en enfermos celíacos y en controles.

HLA	PACIENTES	CONTROLES	RR	p
DR1	3.2	11.5	0.1	<0.001
DR2	0.0	22.3	0.0	<0.00001
DR3	64.5	15.1	10.2	<0.00000001
DR4	9.7	29.5	0.2	n.s
DR5	40.3	29.5	1.6	n.s
DR6	0.0	16.5	0.0	<0.001
DR7	56.4	25.9	3.7	<0.0001
DR8	9.7	10.0	0.9	n.s
DR9	1.6	5.7	0.2	n.s
DR10	0.0	1.4	0.0	n.s
DQw1	3.2	51.1	0.03	<0.00000001
DQw2	95.3	40.3	29.1	<0.00000001
DQw3	59.7	78.4	0.4	n.s
-----				
PACIENTES= 62	CONTROLES= 139	n.s = no significativo (p>0.1)		

Tabla 11b: frecuencia de distribución del fenotipo HLA-DR en pacientes y controles.

HLA-DR	Pacientes (n=62)	Controles (n=139)	RR	valor p
DR3/x	9.68	2.15	5.03	<0.05
DR3/DR5	9.67	0	14.89	<0.005
DR3/DR7	25.80	0	48.34	<0.0005
DR3/otro	19.35	12.94	1.61	NS
DR5/x	0	5.03	0	NS
DR5/7	29.03	7.19	5.27	<0.0005
DR5/otro	3.2	17.26	1.6	<0.005
DR7/x	0	1.43	0	NS
DR7/otro	1.61	17.26	0.08	<0.005
otro/otro	3.22	36.69	0.06	<0.0005

RR = riesgo relativo    p = probabilidad no corregida para el nro. de comparaciones.

## CARACTERIZACION MOLECULAR DE LOS ALELOS HLA ASOCIADOS A LA ENFERMEDAD CELIACA EN LA ARGENTINA.

### 1) Análisis de los RFLPs asociados a los genes HLA-DP en pacientes celíacos y normales de origen latinoamericano:

Teniendo en cuenta que los EC argentinos exhiben asociación con algunas especificidades serológicas que no se asocian en celíacos sajones (ej. DR5), decidimos investigar si ciertos RFLPs asociados a enfermos celíacos en sajones están presentes en latinos.

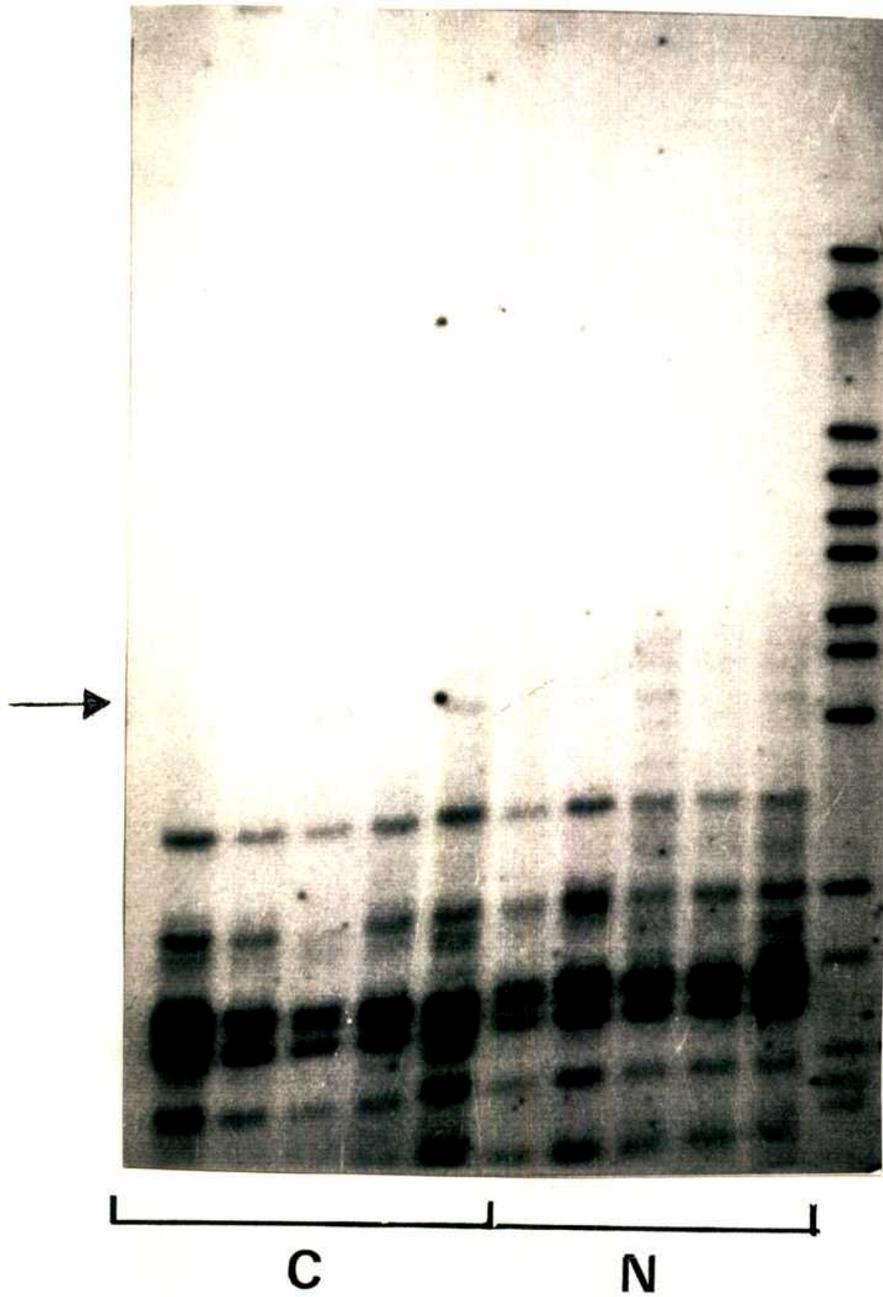
Howell y col. (1986), describieron un fragmento de 4 kb producto de la digestión con la enzima RsaI e hibridización con la sonda DQ $\beta$ , presente en 18 de 20 EC DQw2, pero sólo en 2 de 11 controles DQw2. Con los fines de determinar si la misma asociación está presente en nuestra población celíaca caucasoide latinoamericana, se preparó DNA de 55 pacientes y 27 controles normales que habían sido previamente tipificados por serología como HLA-DQw2. Los mismos fueron digeridos con RsaI y analizados por Southern Blot y posterior hibridización con las sondas HLA-DQ $\beta$  y DP $\beta$  (Fig.12 y 13).

Como se puede observar en las Figuras 12 y 13, la detección de este fragmento con una sonda DQ $\beta$  es producto de hibridización cruzada entre los genes DP $\beta$  y DQ $\beta$ . La mayor intensidad con la sonda DP $\beta$ , demuestra que este fragmento corresponde al locus DPB.

No se hallaron diferencias significativas entre controles (70%) y pacientes (56%) para la frecuencia de este RFLP (Tabla 12). Esto sugiere que, la población caucasoide analizada por Howell y col. y la caucasoide latinoamericana estudiada en nuestro país difieren en la frecuencia de asociación para este fragmento. Estos resultados no se modifican significativamente cuando se excluyen del análisis los individuos portadores del haplotipo DR5/7 (el cual se encuentra asociado a la EC en Argentina pero no en la población sajona).

Este fragmento DP $\beta$  RsaI de 4 kb fue posteriormente asociado con los pacientes EC portadores del haplotipo extendido DQw2,DR3 (Howell 1988). Si sólo tomamos en consideración para nuestro análisis los pacientes DQw2,DR3, nuevamente no encontramos diferencias significativas entre enfermos y controles normales en nuestra población (Tabla 12).

Figura 12: Autorradiografía del patrón de fragmentos de restricción de 5 enfermos celíacos y 5 controles normales portadores del fenotipo DQw2. El DNA fue digerido con la enzima RsaI e hibridizado con una sonda DQB. El marcador de tamaño molecular fue M2. La flecha indica la banda de 4 kb de débil intensidad descripta como polimórfica en la población anglosajona.



**Figura 13:** La misma membrana de la Figura 12 fue re-hibridizada con una sonda DPB. La flecha indica la posición de la banda de 4 kb. de fuerte intensidad, sugiriendo que este fragmento posee mayor homología con el gen DPB que con DQB.

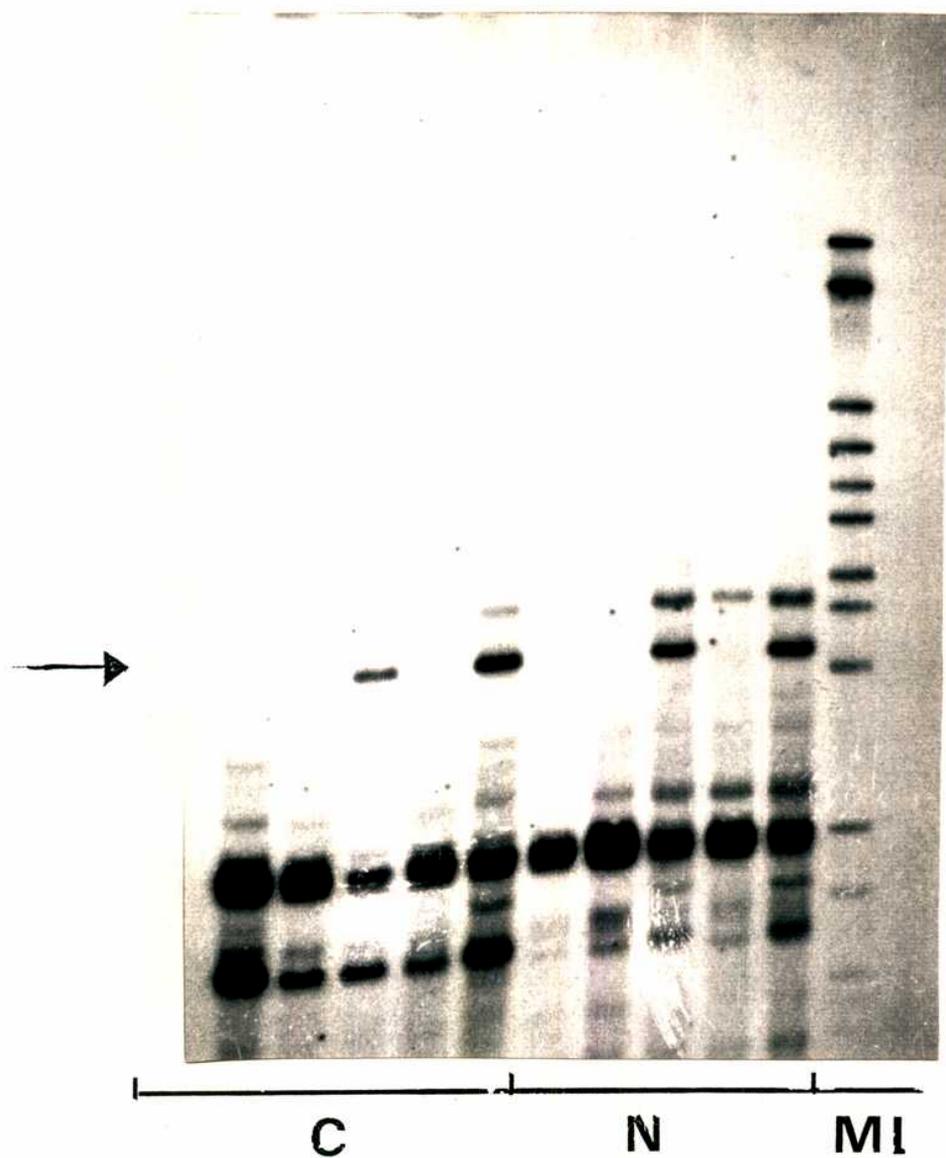


Tabla 12: Frecuencia del fragmento DPB RsaI/4 kb en pacientes y controles latinoamericanos DQw2 positivos.

TIPIFICACION HLA	Frecuencia del RFLP		
	Controles	Pacientes	p
DQw2 totales	70% (19/27)	56% (31/55)	NS
DQw2 excluidos DR5/7	76% (13/17)	59% (22/37)	NS
DQw2,DR3	67% (6/9)	61% (22/36)	NS
HLA-no DQw2,DR3	33% (7/21)	33% (1/3)	NS

Fueron incluidos en este estudio los pacientes #1 a #58 listados en la Tabla 10.

En nuestra población, la frecuencia de esta banda en individuos normales que no son DQw2,DR3 (33%), no difiere significativamente de la encontrada por Howell y col. (44%). A pesar que se consideraba hasta el presente la ausencia de desequilibrio de ligamiento entre el locus DQ y DP (Sanchez-Perez 1986), por las frecuencias observadas de este fragmento tanto en individuos normales como en pacientes, podemos inferir que el fragmento RsaI/DPB 4 kb se halla claramente en desequilibrio de ligamiento con el alelo DQw2 tanto en individuos normales como en pacientes de origen latino. Además, la frecuencia de este RFLP en latinoamericanos no solamente se encuentra aumentada en individuos DQw2,DR3, ya que, el 60% de los controles (6/10) y el 47% de los pacientes (9/19) del haplotipo DQw2,no DR3 también portan este fragmento.

Se analizó la segregación de este fragmento RsaI/DPB de 4kb en dos familias de enfermos celíacos, con los fines de ver si el mismo es heredado únicamente por los niños portadores de la EC (Tabla 13).

Los resultados observados (Tabla 13) muestran que no hay una asociación diferencial de este RFLP con los niños portadores de la enfermedad. En la familia 1, tanto el padre como la madre son portadores de este fragmento, el cual ha sido heredado por los 3 hijos (uno sano y dos enfermos). En la familia 2, el padre portador de este RFLP a los niños, y la madre no lo presenta. En esta familia hay dos niños enfermos, de los cuales uno porta este fragmento y el otro no, y dos niños sanos, uno negativo y otro positivo para el mismo. Por lo tanto, la presencia de este RFLP en la población latinoamericana, no es determinante para la susceptibilidad a la enfermedad celíaca.

Tabla 13: Estudio de segregación familiar de fragmentos de restricción generados por la enzima RsaI y detectados con la sonda DPB. El asterisco (\*) denota a los hijos afectados de EC.

-----  
FAMILIA 1:

	Fenotipo HLA		Fragmento DPB RsaI/4 kb.
	DR	DQ	
PADRE	3/7	w2	+
MADRE	5/7	w2/w3	+
HIJO 1 *	3/7	w2	+
HIJO 2 *	3/5	w2/w3	+
HIJO 3	7/7	w2	+

FAMILIA 2:

	Fenotipo HLA		Fragmento DPB RsaI/4 kb.
	DR	DQ	
PADRE	5/5	w3	+
MADRE	7/2	w2/w1	-
HIJO 1 *	7/5	w2/w3	+
HIJO 2 *	7/5	w2/w3	-
HIJO 3	7/5	w2/w3	+
HIJO 4	7/5	w2/w3	-

-----

Niven y col (1987), describieron un fragmento BglII de 3.5 kb luego de la hibridación con una sonda correspondiente al gen DP $\alpha$ , que se halla significativamente asociado a al EC en pacientes británicos (independientemente de los alelos DQ y DR presentes).

Para investigar la asociación de este RFLP en nuestra población celíaca, se analizó el DNA de 38 pacientes y 39 controles (todos portadores del alelo DQw2) (Figura 14).

Los resultados mostraron la presencia de esta banda en 39% de enfermos y 44% de controles (Tabla 14). Nuevamente, no se hallaron diferencias significativas cuando se excluye de estos estudios a los individuos portadores del haplotipo DR5/7, no asociado a la EC en la población sajona (Tabla 14).

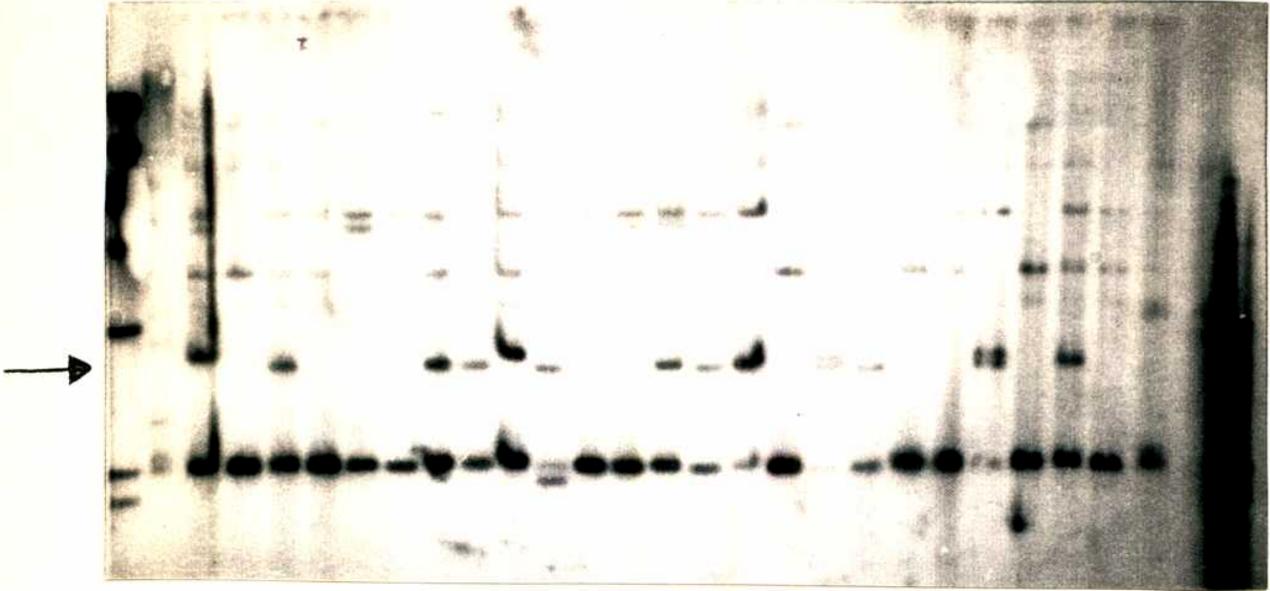
**Tabla 14:** Frecuencia del fragmento DPA BglII/3.5 kb en pacientes y controles latinoamericanos.

	Frecuencia de RFLP		
	Controles	Pacientes	p
Total	41% (17/29)	39% (15/38)	NS
Excluidos DR5/7	44% (12/27)	41% (11/27)	NS

Se incluyeron en este análisis los pacientes No. 20 a 57 listados en la Tabla 10.

A diferencia con el RFLP para DP $\beta$ , la frecuencia del fragmento DP $\alpha$  en la población normal es idéntica en ambos grupos étnicos: 35% y 44%. Por lo tanto, es la población celíaca latinoamericana, en contraste con la británica, la que carece de una asociación significativa con esta banda.

Figura 14: DNA de pacientes celíacos digerido con la enzima BglII e hibridizados con la sonda DPA. La flecha indica la posición de la banda de 3.5 kb asociada a la susceptibilidad a la EC en la población sajona.

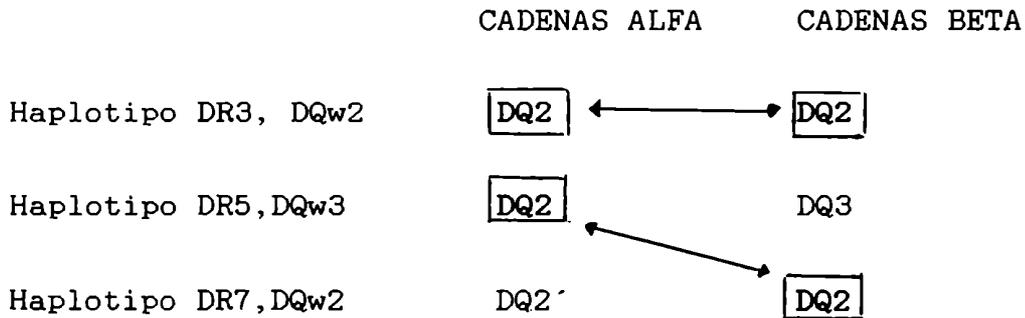


Con la caracterización nucleotídica del dominio polimórfico de los genes DP, se pudieron definir las variantes alélicas correspondientes a los genes DPA y DPB (Bugawan 1988) y de esta forma sintetizar oligonucleótidos que pudieran reconocer estas variantes. Estudios de caracterización de los alelos presentes en pacientes con EC en Estados Unidos (Kagnoff 1989) mostraron la asociación de la EC a los alelos DPB1 0101 y DPB1 0301. Además, mostraron la correlación entre el fragmento RsaI/DPβ 4 kb y los alelos DPB1 0101, DPB1 0301 y DPB1 0501. Estudios realizados en pacientes de origen italiano (Bugawan 1989) mostraron una asociación predominante con el alelo DPB1 0402 a diferencia de los enfermos celíacos sajones. Teniendo en cuenta la similitud en las asociaciones serológicas entre EC en italianos y argentinos, esto podría explicar la falta de asociación al fragmento RsaI/DPβ 4 kb en los pacientes argentinos, ya que como mencionamos antes, este fragmento viene asociado a los alelos presentes en la población sajona. En 1990, un trabajo realizado sobre la población celíaca noruega (Spurkland 1990) mostró que la frecuencia del alelo DPB1 0101 se hallaba aumentada en celíacos respecto de los controles normales. Sin embargo, se observó que este alelo DPB también presentaba desequilibrio de ligamiento con los alelos DQ presentes en celíacos y normales. Por lo tanto, la diferencia en frecuencia de este alelo DP dejó de ser significativo cuando se comparaban pacientes y controles portadores del alelo HLA-DQw2, responsable de la asociación primaria.

## 2) Bases moleculares de la asociación del alelo DR5

Hacia 1987 los primeros estudios de RFLP para los genes HLA de clase II describieron la existencia de ciertas correlaciones entre RFLP y serología. Como vimos anteriormente, el XWIH confirmó y extendió estas correlaciones. Trabajos que utilizaron la enzima TaqI con la sonda DQA (Trucco 1986), mostraron la presencia de un fragmento común de 4.6 kb en aquellos individuos portadores de los alelos DR3 y DR5 y predijeron la presencia de cadenas DQA idénticas asociadas a estos alelos. Esto fue confirmado posteriormente por determinación de la secuencia nucleotídica (Schiffenbauer 1987). Por otro lado, la cadena DQA asociada al alelo DR7 mostraba con esta enzima una banda de 5.5 kb, lo que sugeriría una cadena DQA diferente a pesar de que tanto los individuos DR3 como DR7 se

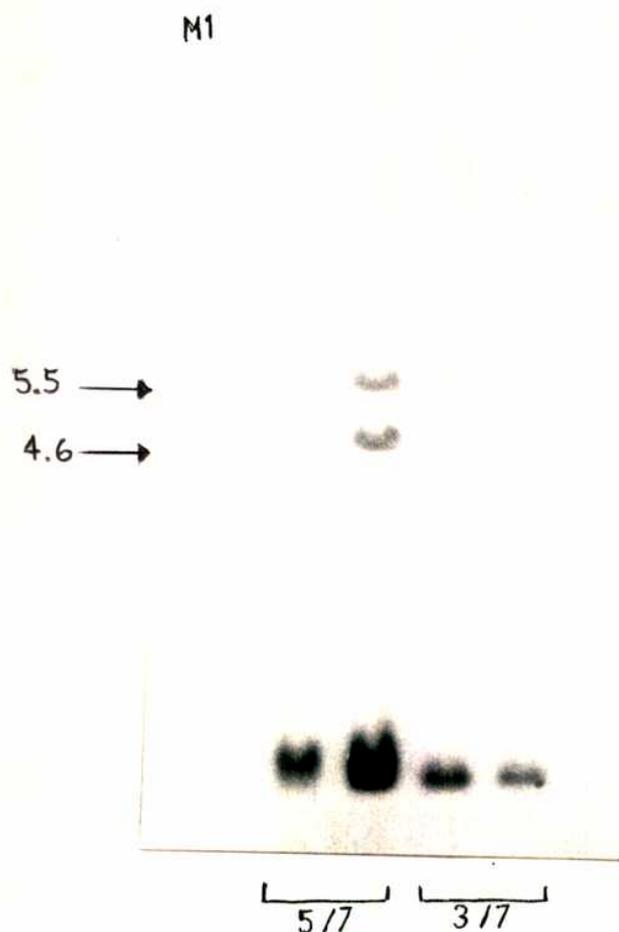
encuentran en desequilibrio de ligamiento con el alelo DQw2. El hecho de que la especificidad DQ asociada a los alelos DR3 y DR7 sea la misma se debe a que los sueros utilizados para la tipificación reconocen epitopes HLA-DQw2 en la cadena DQB y no en la cadena DQA. Estos antecedentes nos llevaron a pensar que los pacientes celíacos DR5 podrían ser portadores de una de las cadenas del dímero de riesgo DQw2: la cadena DQA. Así se explicaría por ejemplo que los heterocigotas DR5/DR7 podrían ensamblar en "trans" una molécula DQw2 con una cadena DQA codificada por un padre y una DQB codificada por el otro.



Con el objeto de estudiar esta hipótesis se hicieron los experimentos descriptos a continuación.

Con el fin de conocer si los pacientes celíacos heterocigotas DR5/7 presentan un RFLP para DQA igual a la que portan los pacientes DR3, se digirió el DNA de dos pacientes HLA-DR3/7 y dos pacientes HLA-DR5/7 con la enzima TaqI y se los hibridizó con una sonda correspondiente al gen DQA. La Figura 15 muestra en ambos haplotipos la presencia de dos bandas: la banda de 5.5 kb correspondiente a la cadena DQA asociada al alelo DR7 y la banda de 4.6 kb asociada a los alelos DR5 y DR3. Estos resultados coinciden con lo hallado anteriormente en individuos normales (Trucco 1986) y sugiere que los alelos DR5 y DR3 de los celíacos argentinos comparten las cadenas DQA. Ya que la asociación serológica primaria a la EC en nuestra población es con el alelo DQw2, los resultados estarían de acuerdo con nuestro postulado (Palavecino 1987) que el dímero DQ de riesgo en los individuos DR5/7 se formaría por trans-asociación entre la cadena DQA aportada por el DR5 y la

Figura 15: Autorradiografía del patrón de fragmentos de restricción del DNA de 2 pacientes DR5/7 y 2 pacientes DR3/7, digeridos con TaqI e hibridizados con la sonda DQA. La flecha indica una banda de 4.6 kb presente en los fenotipos DR3 y DR5. La banda de 5.5 kb corresponde al alelo DR7 presente en las muestras.



cadena DQB aportada por el DR7. De esta forma se obtendría una molécula DQw2 de riesgo idéntica a la presente en los individuos DR3. La expresión en "trans" de dímeros DQ en individuos heterocigotas ya había sido demostrada en ciertas combinaciones fenotípicas (Charron 1984). Estudios realizados en el año 1987 en individuos diabéticos insulino dependientes portadores de el haplotipo DR3/DR4, DQw2/DQw3 (Nepom 1987) mostraron la presencia en la membrana de moléculas DQ conformadas por la trans-asociación de la cadena beta DQw3 con la cadena alfa DQw2.

### 3) Caracterización molecular de los alelos DQA y DQB presentes en enfermos celíacos argentinos DR5/7.

Los resultados de RFLP recién descriptos sugirieron que los haplotipos DR3 y DR5 comparten la misma cadena DQA. A fin de confirmar la presencia de este mismo alelo DQA y del alelo DQB común a los haplotipos DR3 y DR7, se realizó una tipificación molecular de 18 enfermos celíacos argentinos DR5/7. Para ello se utilizó la técnica de amplificación mediada por polimerasa "PCR" (Todd 1987) del segundo exón (el dominio polimórfico) de los genes DQA1 y DQB1 a partir de DNA genómico.

Luego de la reacción de PCR, se utilizó un 5% del material para confirmar por electroforesis en geles de agarosa la presencia de fragmentos de aproximadamente 240 bp (Fig.16). Un 10% del material amplificado se sembró por "Dot Blot" en membranas de nylon. Mediante la hibridización con oligonucleótidos específicos, se estudió la presencia en estos individuos de las cadenas DQA1 y DQB1 (Schiffenbauer 1987) responsables de codificar el alelo DQw2. El Comité de Nomenclatura de los alelos del sistema HLA de la Organización Mundial de la Salud, designa actualmente a los alelos DQA y DQB presentes en el haplotipo DR3, DQw2, como DQA1 0501 y DQB1 0201.

La Figura 17 muestra la hibridización del material con el oligonucleótido 242 específico para la cadena DQA1 0501. Este oligonucleótido reconoce una secuencia única del alelo DQA1 0501 (ver Materiales y Métodos). Como se puede observar, 16/16 EC dan hibridización positiva para este alelo, el cual sería aportado por el haplotipo DR5. Como controles negativos se utilizó material amplificado de los genes DQA de dos líneas homocigotas, una para DR7 y otra para

DR5: se observó señal negativa para el primero y positiva para el segundo (ver Fig.17). Estas observaciones confirman que los alelos DQA presentes en los haplotipos DR5 y DR7 son diferentes.

La Figura 18 muestra la hibridización con el oligonucleótido 233 específico para el alelo DQB1 0201 (ver Mat. y Met.), del material amplificado de la cadena DQB1 de 50 EC, incluyendo 18 heterocigotas DR5/7. Como podemos observar, todos los EC (incluidos los DR5/7) portan este alelo, el cual está presente por desequilibrio de ligamiento en los haplotipos DR3 y DR7. Como controles se usaron productos DQB amplificados de una línea homocigota DR7, la que dió señal positiva con esta sonda, ver fig.18). Cuando se hibridizó la misma membrana con un oligonucleótido 238 (ver Mat. y Met.) específico para la cadena DQB1 0501 (presente en los individuos que portan el alelo DQw1) (Bodmer 1990), sólo dió señal positiva un individuo EC DR3/1, DQw2/1 (Fig.19). Esto nos muestra la gran especificidad de los oligonucleótidos utilizados.

En conclusión, teniendo en cuenta que la cadena DQA1 0501 es aportada por el haplotipo DR5 y la cadena DQB1 0201 por el haplotipo DR7, los resultados sugieren que en los enfermos celíacos argentinos heterocigotas DR5/7 se podría generar por trans-asociación un heterodímero de riesgo DQA1 0501/DQB1 0201 idéntico al presente en los individuos DR3. En 1989, estudios de EC en una población noruega de 94 pacientes (Sollid 1989), mostraron la presencia de bandas de RFLP únicas para DQA y DQB en los enfermos celíacos. Postularon de este modo que la susceptibilidad a desarrollar la EC parecería primariamente asociada a la presencia de una cadena DQA1 0501 (en desequilibrio de ligamiento con los alelos DR3 y DR5) y una cadena DQB1 0201 (en desequilibrio con los alelos DR3 y DR7). En base a 3 pacientes DR5/7 apoyaron la idea de la trans-asociación de estas cadenas. Cabe destacar que los oligonucleótidos usados como sonda sólo indican que, al menos en la región que ellos reconocen, los productos amplificados poseen identidad. No descartan la presencia de diferencias en otras porciones de la molécula.

Figura 16: Electroforesis en gel de agarosa 2 % de los productos de amplificación del dominio polimórfico de los genes DQB de 7 pacientes celíacos. Como podemos observar, el tamaño de los fragmentos es el esperado (~240 bp). El DNA del paciente No.7 no pudo ser amplificado.

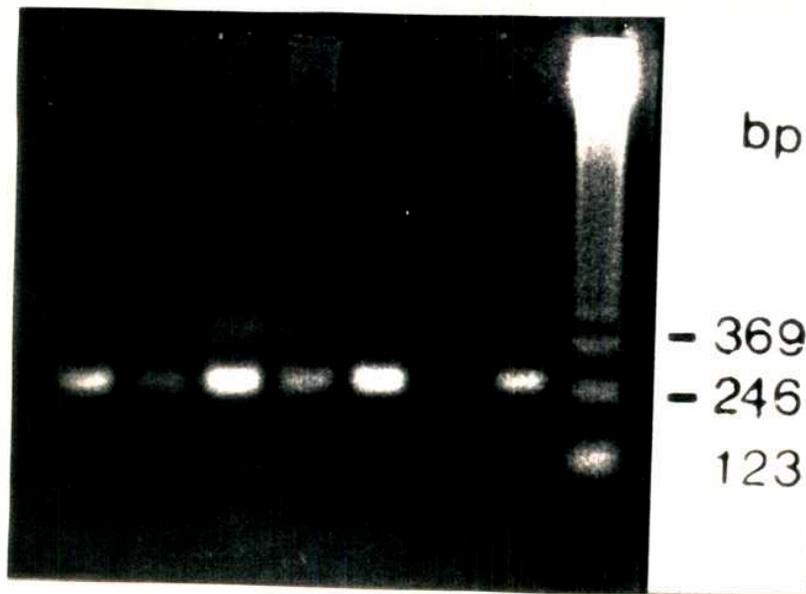
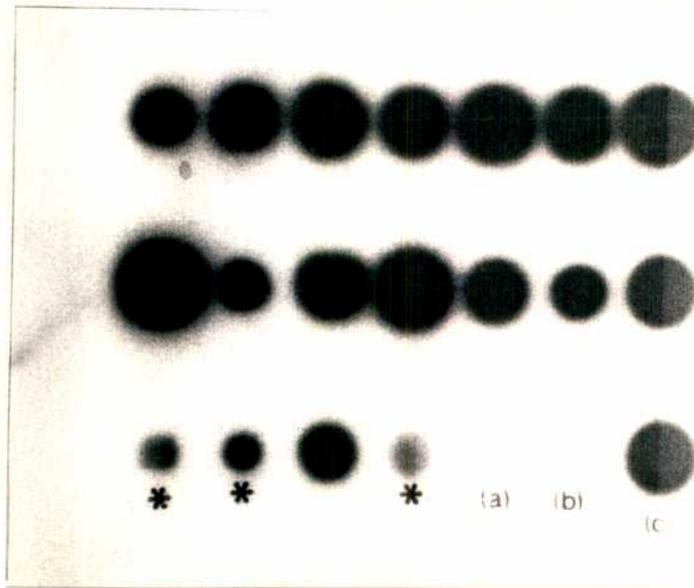


Figura 17: Autorradiografía de la hibridización en "Dot Blot" de los productos de PCR del dominio polimórfico de los genes DQA de 18 pacientes EC DR5/7. En paralelo se sembró como control, el DNA amplificado de 3 líneas homocigotas DR7, DR2 y DR5 (últimas tres siembras = a, b y c). \* = pacientes DR5/7 que no amplificaron bien. La hibridización se llevó a cabo con el oligonucleótido 242, específico del alelo DQA 0501.



**Figura 18:** Autorradiografía de la hibridización en "Dot Blot" de los productos de PCR del dominio polimórfico de los genes DQB de 50 enfermos celíacos. La hibridización se llevó a cabo con el oligonucleótido 233 específico de la variante DQB 0201. Los 18 primeros pozos, corresponden al DNA de pacientes DR5/7. En paralelo se sembró DNA amplificado de una línea homocigota DR7 (b = control positivo) y una línea homocigota DR2 (a = control negativo). NA = DNA no amplificado.

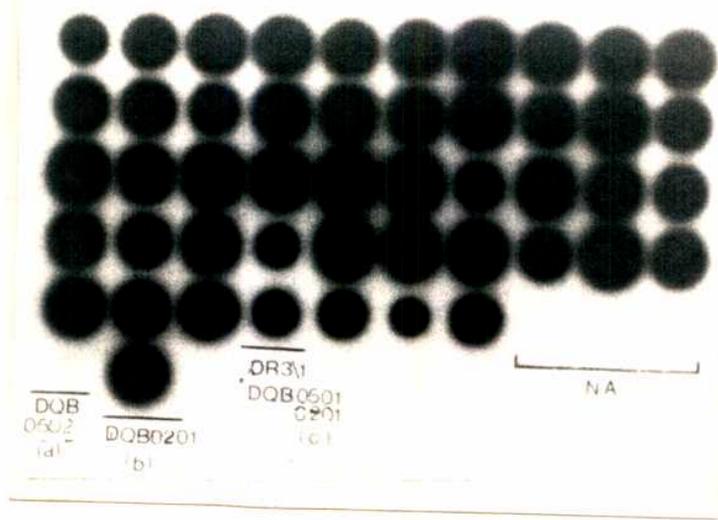


Figura 19: La misma membrana de la Figura 18, re-hibridizada con el oligonucleótido 238, específico de la variante DQB 0501 presente en el fenotipo DR1. Obsérvese que solo dió hibridización positiva un paciente caracterizado serológicamente como DR3/1, DQw2/w1 ("c" en la Figura 18).



DR3/1  
DQB0501  
0701

#### 4) Búsqueda de RFLPs específicos en los enfermos celíacos portadores del fenotipo DR5/7.

El 29% de los pacientes con EC en la Argentina son portadores del fenotipo DR5/7 (7.19 % en normales). Este fenotipo no se halla aumentado en celíacos de otros grupos étnicos. Con el fin de conocer las bases genéticas de esta asociación, se diseñaron experimentos tendientes a estudiar la eventual presencia de polimorfismos de los alelos DR5 y DR7 (no discernibles con los oligonucleótidos mencionados arriba) que permitan distinguir variantes según su origen étnico o que estén asociadas preferentemente a los individuos enfermos.

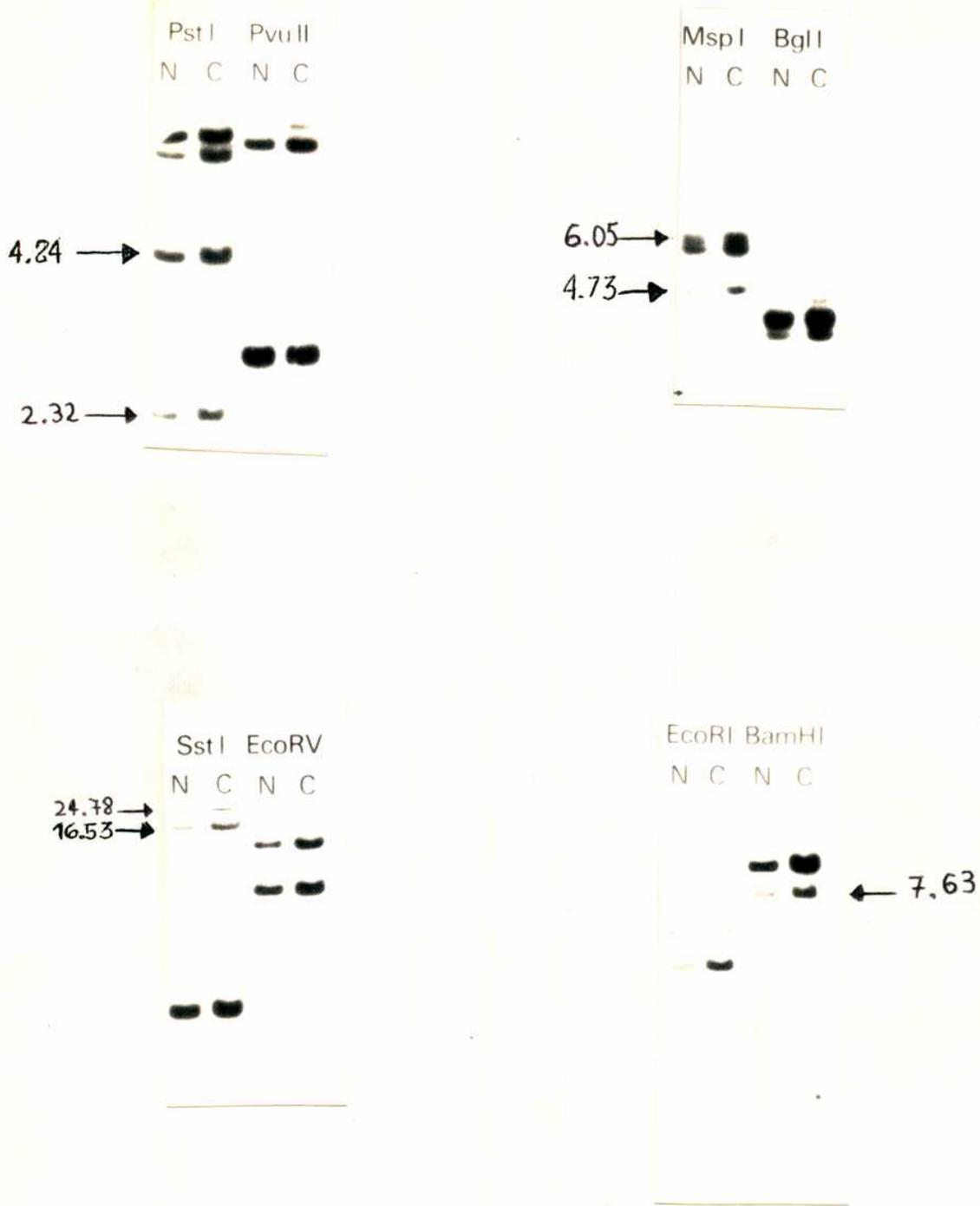
Como estrategia para una rápida búsqueda de polimorfismos genómicos entre individuos EC y controles normales, se prepararon dos mezclas ("pooles") de DNA, una conteniendo muestras de DNA de 5 controles y la otra conteniendo DNA de 7 pacientes. Para esto se tuvo especial precaución de agregar cantidades iguales de DNA de cada muestra. En el caso de existir diferencias a nivel molecular entre individuos normales y enfermos, estas se evidenciarían en las mezclas por la presencia de algún fragmento distinto entre los pooles, o por un aumento en la intensidad de alguna banda en común en alguna de las dos mezclas; esto significaría la presencia de mayor frecuencia de algún RFLP en una de las dos poblaciones. Estudios similares permitieron definir desequilibrios de ligamiento entre determinados RFLPs asociados a HLA de clase II en pacientes diabéticos insulino-dependientes (Arnheim 1985).

Las mezclas se digirieron por separado con 8 enzimas distintas (EcoRI, PstI, PvuII, EcoRI, EcoRV, MspI, BglI, SstI y BamHI) y se las hibridizó (por la técnica del Southern) secuencialmente con las sondas de los genes DR $\beta$ , DQ $\beta$  y DQ $\alpha$  provistas por el XWIH y descritas en los Materiales y Métodos.

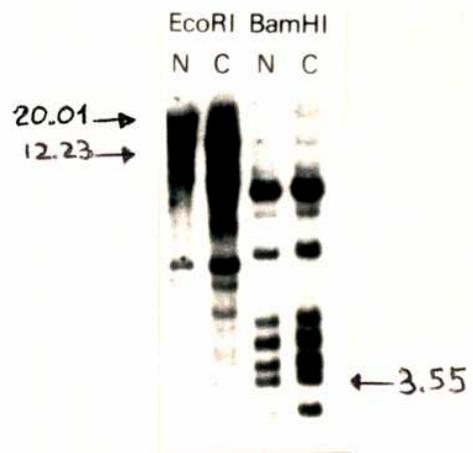
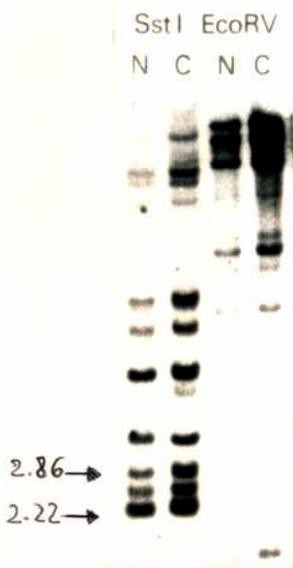
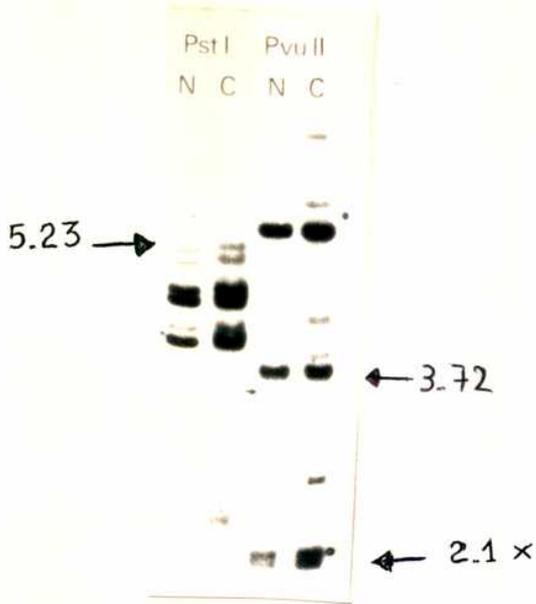
En la Figura 20 pueden observarse los resultados obtenidos. No se hallaron diferencias en los patrones de hibridización de ambas mezclas para estos genes. Estos resultados sugieren que, al menos al nivel de resolución del análisis por RFLP, los genes HLA-DR5/7 y sus genes de clase II asociados no difieren entre pacientes EC e individuos normales de origen latinoamericano.

**Figura 20:** Patrones de RFLP obtenidos con mezclas de DNA de individuos normales (N) DR5/7 y celíacos (C) DR5/7. Las mezclas fueron digeridas independientemente con las enzimas indicadas e hibridadas con las sondas DQA (a), DQB (b) y DRB (c). Los fragmentos indicados son los definidos por el XWIH como específicos para los alelos DQA y DQB en los fenotipos DQw2 y DQw7.

**a**



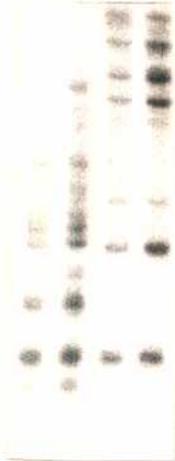
b



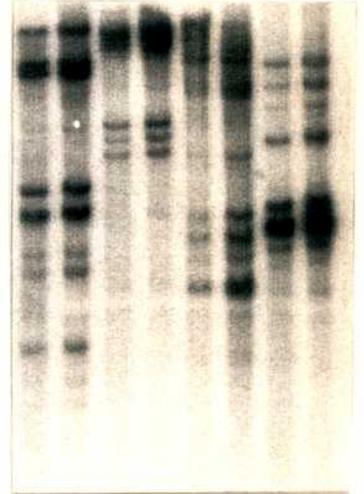
PstI PvuII  
N C N C



MspI BglI  
N C N C



SstI EcoRV EcoRI BamHI  
N C N C N C N C



Como mencionamos anteriormente, existe un fuerte desequilibrio de ligamiento entre los genes DR y DQ, lo que hace que, determinados productos del locus DR segreguen con determinados alelos del locus DQ. Este estudio nos permite también confirmar que el desequilibrio de ligamiento se conserva en estos individuos, ya que, los patrones de restricción son los mismos en todos los individuos estudiados a nivel de los genes DQ $\alpha$ , DQ $\beta$  y DR $\beta$ .

Los patrones de bandas obtenidos en este estudio fueron comparados con los patrones para DQA y DQB determinados por el XWIH y publicados en el libro "Immunobiology of HLA" (1987) y se pueden visualizar en la Figura 20:

Para la cadena DQA asociada a los alelos DR3 y DR5 se definieron según el XWIH las siguientes bandas: PstI 4.24 kb, MspI 4.73 kb y SstI 16.53 kb. La Figura 20 muestra la presencia de estas bandas en los pacientes y controles. Esto confirma la identidad de las cadenas DQA en desequilibrio con las variantes DR3 y DR5. Para el alelo DQA presente en individuos DR7, también se hallaron las mismas bandas definidas por el XWIH: PstI 2.32 kb, MspI 6.05 kb, SstI 24.78 kb y BamHI 7.63 kb.

Para la cadena DQB del alelo DR7 se describieron los fragmentos PstI 5.23, PvuII 2.1 kb y EcoRI 20.01 kb. Las mismas coinciden con lo descrito por el XWIH tanto para las cadenas DQB asociadas al DR3 como al DR7. Las bandas SstI 2.86, SstI 2.22, PvuII 3.72 kb, EcoRI 12.23 kb y BamHI 3.55 kb que definen a la cadena DQB asociada al DR5, también fueron encontradas en estos individuos.

En conclusión, a este nivel de resolución, no se hallaron diferencias entre los genes DQA, DQB y DRB entre pacientes y controles. Además, los patrones de bandas presentes en los sujetos estudiados son iguales a los definidos por el XWIH para estos alelos. No podemos descartar en estas moléculas cambios puntuales que no sean discernibles por RFLP u oligonucleótidos. Por ello, el próximo paso fue buscar posibles diferencias a nivel nucleotídico en los dominios polimórficos de los genes de clase II en nuestros EC DR5/7 respecto de las secuencias publicadas para estos genes en la población sajona. Esta pregunta es de fundamental importancia ya que, una posible diferencia a nivel nucleotídico en esta zona podría afectar la funcionalidad de las moléculas de clase II.

5) Clonado y secuenciación de los genes de histocompatibilidad de clase II de dos enfermos celíacos portadores del haplotipo DR5/7.

Para este estudio, se seleccionaron dos pacientes DR5/7 ECPBL y EC329. Del paciente ECPBL se obtuvo el RNA a partir de linfocitos de sangre periférica. A partir del mismo se sintetizó un cDNA del cual posteriormente se amplificó por PCR el segundo exón (dominio polimórfico) de los productos de los genes DQA, DQB y DRB.

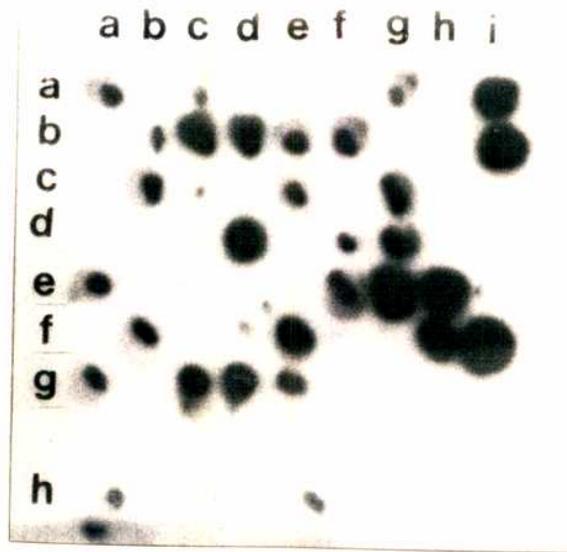
Del paciente EC329 se obtuvo DNA a partir de leucocitos de sangre periférica, del cual se amplificó el dominio polimórfico de los genes DQA1, DQB1 con los primers específicos detallados anteriormente para la caracterización por Dot Blot.

Los productos de amplificación de estos dos individuos fueron purificados de acuerdo a las técnicas descritas en Materiales y Métodos, y subclonados luego de la digestión con EcoRI en un vector pUC19-EcoRI-Bap. Estos subclones se usaron para transformar bacterias DH5 $\alpha$  competentes. Las colonias transformantes se seleccionaron por crecimiento en placas con ampicilina y las colonias portadoras de plásmidos recombinantes se las seleccionó por hibridización con sondas radiactivas correspondientes a los genes DQA, DQB y DRB. La Figura 21 muestra un ejemplo del screening hecho para estos genes de clase II. Los resultados de la búsqueda fueron los siguientes:

Para EC329 se obtuvieron: gen DR $\beta$ : 12 clones  
gen DQ $\beta$ : 21 clones  
gen DQ $\alpha$ : 11 clones

Para ECPBL se obtuvieron: gen DR $\beta$ : 13 clones  
gen DQ $\beta$ : 20 clones  
gen DQ $\alpha$ : 11 clones

Figura 21: Autorradiografía del "screening" de clones portadores de productos de amplificación para el dominio polimórfico de los genes DQA de el paciente EC329. La sonda que se utilizó corresponde al gen DQA. Los números y las letras indican la orientación de los clones en la placa. En la fila (h) se indica la posición de algunas colonias azules crecidas como control negativo.



Los plásmidos extraídos de estas colonias fueron secuenciados por el método de Sanger. Se secuenciaron ambas cadenas de DNA utilizando primers "forward" y "reverse" y el kit de Secuensa. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

**-Genes DRB:**

Los genes DRB de los pacientes ECPBL y EC329 presentan dominios polimórficos de las cadenas DRB1 1101 (Bodmer 1990) y DRB1 0701 (Tieber 1986), correspondientes a las variantes alélicas DR5 y DR7 respectivamente. Para el paciente ECPBL se caracterizó la secuencia la variante DRB1 1101 desde la posición -12 hasta el codón 94; y la variante DRB1 0701 desde el codón 1 al 94. No se hallaron diferencias en la secuencia respecto de las secuencias publicadas en la bibliografía (Bodmer 1990, Tieber 1986). Las mismas conclusiones se obtuvieron al estudiar el paciente EC329, para el cual se encontró la variante DRB1 1101 (codones 22 al 93) y la variante DRB1 0701 (codones 18 a 90). Además para este paciente se definió por secuencia la cadena DRB3 0202 (codón 18 al 90) correspondiente a una de las variantes alélicas de la especificidad DRw52 en desequilibrio de ligamiento con los alelos DR3 y DR5 (Didier 1986). No se hallaron diferencias con las secuencias publicadas.

**Genes DQB:**

En ambos pacientes se caracterizaron los codones desde la posición 6 a la 83 las cadenas correspondientes a las variantes DQB1 0301 (Holbeck 1988) y DQB1 0201 (Schiffenbauer 1987) en desequilibrio de ligamiento con los alelos DR5 y DR7 respectivamente (Bodmer 1990). No se hallaron diferencias con las secuencias publicadas.

**Genes DQA:**

En ambos pacientes se definieron por secuencia los alelos correspondientes a las variantes DQA1 0501 y DQA1 0201 (Schiffenbauer 1987) presentes en los haplotipos DR5 y DR7 respectivamente (Bodmer

1990), sin diferencias con las secuencias publicadas. Para ECPBL los clones secuenciados abarcan desde la posición 1 a 155. Para EC329 se caracterizaron clones desde la posición 13 a 90 (DQA1 0501) y 12 a 88 (DQA1 0201).

En conclusión, no se hallaron diferencias en las secuencias polimórficas para estos genes en los pacientes latinos respecto de las secuencias publicadas para la población sajona. Las cadenas DQA1 0501 y DQB1 0201 potencialmente capaces de formar una molécula DQw2 susceptible por trans-asociación, se encuentran presentes en estos pacientes, pero no se halló ninguna diferencia que explique la susceptibilidad diferencial a la enfermedad celíaca en estas dos poblaciones.

No podemos descartar en estas moléculas, la existencia de diferencias en los dominios proximal de membrana o de transmembrana (ver Fig.3) que favorezcan la formación de un dímero HLA-DQ en ciertos individuos respecto de otros.

#### **6) Estudio de las variantes HLA-DQ potencialmente "permissivas" a la EC:**

Como ya se mencionó anteriormente, en nuestra población (Herrera 1989) el alelo DQw1 se halla disminuido significativamente en los pacientes celíacos (3.1 % en pacientes vs. 51.1% en controles). Esto sugeriría un rol "protector" del alelo DQw1 para la EC. Sin embargo, hay otros alelos HLA-DQ que se hallan más frecuentemente presentes en los pacientes acompañando en heterocigosis al haplotipo DR3, DQw2. Estos alelos son: DR5, DR4 y DR8. Estos alelos, tal cual se muestra en la Tabla 11a, no se hallan significativamente asociados a la EC. Sin embargo, su presencia en heterocigosis con el alelo DR3 podría hablar de una función "permissiva" o neutra para la enfermedad. El carácter neutro o permissivo de determinados alelos HLA en asociación a enfermedades autoinmunes fue descrito anteriormente para la diabetes insulino dependiente (Todd 1987). El alelo DQw7 en desequilibrio de ligamiento con el alelo DR5 es de por sí un alelo "permissivo" para la EC. Con los fines de conocer las variantes HLA-DQ (además del alelo DQw2) presentes en los pacientes DR3/4 y DR3/8, procedimos a la tipificación del DNA de estos pacientes mediante oligonucleótidos específicos para la cadena DQB. Para ello a partir de DNA genómico se amplificó por PCR el dominio

polimórfico de los genes DQB de 5 pacientes DR3/8 y 3 pacientes DR3/4. Los "primers" utilizados son los descriptos anteriormente.

Los productos de amplificación de los genes DQB de los pacientes tipificados serologicamente como DR3/8, fueron sembrados en dot blot. En paralelo se sembró el producto de PCR de: 3 líneas celulares homocigotas DR8 las cuales llevan asociadas distintas cadenas DQB1 (0402, 0301 y 0601), un paciente DR3/4 portador de las cadenas DQB1 0201 y DQB1 0302, y un paciente DR3/7 portador de la cadena DQB1 0201. El DNA de las líneas y del paciente DR3/4 representan todas las variantes de cadenas DQB que hasta ahora fueron descriptas como asociadas a la especificidad DR8 (Bodmer 1990, Todd 1987). Las mismas son: DQB1 0402, 0301, 0601 y 0302. El DNA del paciente DR3/7 carece de estas variantes, por lo tanto fue utilizado como control negativo. La Figura 22 muestra las hibridizaciones llevadas a cabo con oligonucleótidos específicos para cada una de estas variantes DQB (oligos 234, 2302, 3702 y 5707 descriptos en Mat. y Met.). Como podemos observar, uno de los pacientes porta la cadena DQB1 0402 (DQw4), otro la variante DQB1 0301 (DQw7) y el resto presenta la variante DQB1 0302 (DQw8). Ninguno de ellos porta la variante DQB1 0601 (DQw6).

Los productos de amplificación del DNA de los genes DQB de los 3 pacientes DR3/4, fueron corridos en geles de 2% agarosa y transferidos a membranas de nylon por la técnica de Southern Blot. Los 3 pacientes dieron hibridización positiva con el oligonucleótido 236 específico para la variante DQB1 0302 (DQw8) y negativa para el oligo 234 para la variante DQB1 0301 (DQw7) (Figura 23).

Todos estos alelos DQB1 que acompañan al DR3 hallados en los pacientes DR3/4 y DR3/8 (ver Fig.24 y 25) comparten tramos estructurales comunes a los alelos neutros o de riesgo para esta patología (ver discusión más adelante).

**Figura 22:** Autorradiografías de la hibridización en "Dot Blot" de los productos de amplificación del dominio polimórfico de los genes DQB de 5 pacientes DR3/8.

A) La hibridización se llevó a cabo sucesivamente con los oligonucleótidos 2302 (1), 234 (2) y 5707 (3). Estos reconocen las variantes DQB 0402, DQB 0301 y DQB 0302 respectivamente.

a = línea DR8 portadora del alelo DQB 0402.  
 b = línea DR8 portadora del alelo DQB 0301.  
 c = línea DR8 portadora del alelo DQB 0601.  
 g = paciente DR3/4 portador del alelo DQB 0302.  
 e, f, h, i, j = pacientes DR3/8.

B) La hibridización se llevó a cabo con el oligonucleótido 3702 específico de la variante DQB 0601.

a = línea DR8 portadora del alelo DQB 0601.  
 b, c, d, e, f = pacientes DR3/8.

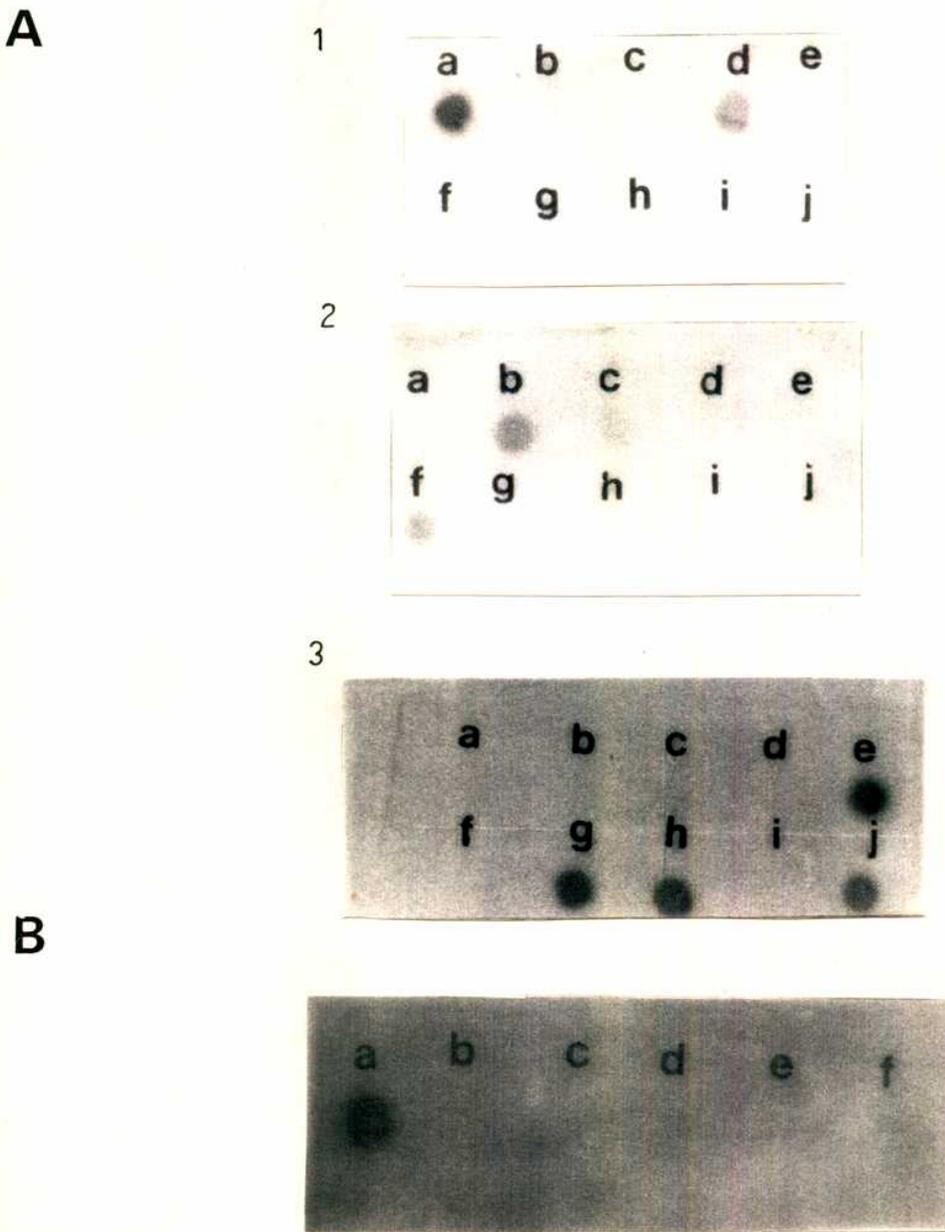


Figura 23: Autorradiografía de la corrida electroforética de los productos de PCR del dominio polimórfico de los genes DQB de 3 pacientes portadores del fenotipo DR3/4 (A, B y C) y un individuo DR4 negativo (D). Las bandas que se ven son producto de la hibridización con el oligonucleótido 236 específico para la variante DQB 0302 presente en los individuos portadores del alelo DR4.



7) Caracterización molecular de los genes de clase II en pacientes que no portan el dímero de susceptibilidad DQA1 0501/DQB1 0201:

Como se menciona anteriormente, la mayoría (95%) de los pacientes con enfermedad celiaca son portadores de las cadenas DQA1 0501 y DQB1 0201 capaces de formar (por asociación en cis o en trans), una molécula de susceptibilidad DQw2. Los individuos que heredan esta especificidad poseen 25 veces más riesgo de desarrollar EC y se sospecha que la molécula DQ estaría íntimamente ligada a la patogénesis más que representar un marcador genético de asociación a la misma. Además, por los datos serológicos (Tablas 10 y 11) vimos que los fenotipos significativamente aumentados en la enfermedad fueron: DR3/7, DR3/x, DR3/5, DR3/otro y DR5/7.

Sin embargo, hay un grupo muy reducido de pacientes que no presentan los fenotipos HLA-DR antes mencionados. Fue entonces nuestro interés, conocer las cadenas DQA y DQB asociadas a los mismos, para conocer la capacidad potencial de estos individuos para codificar la molécula de susceptibilidad DQw2 (eventualmente no detectada por serología). Esta caracterización se llevó a cabo por secuenciación.

Para ello se amplificó por PCR (a partir de DNA genómico) el dominio polimórfico de las cadenas DQA1 y DQB1. Una alícuota del material amplificado se utilizó para hibridización (Dot Blot) con oligonucleótidos específicos de alelo y el resto se subclonó en plásmidos pUC para la determinación de la secuencia nucleotídica.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

1) Para el paciente EC391 cuyo fenotipo de clase II es DR4/7, DQw3/w2, se hallaron las siguientes variantes alélicas:

-DQA: -DQA1 0301 en desequilibrio de ligamiento con el alelo DR4 (Bodmer 1990).

-DQA1 0201 en desequilibrio de ligamiento con el alelo DR7 (Bodmer 1990).

-DQB: -DQB1 0302 alelo presente en una variante de la especificidad DQw3, llamada DQw8 (Todd 1987), presente por desequilibrio de ligamiento en 1/3 de individuos DR4 (Bodmer 1990).

-DQB1 0201 en desequilibrio de ligamiento con el alelo DR7.

Por lo tanto, el paciente EC 391 solo posee la cadena DQB de riesgo pero carece del alelo DQA de riesgo.

2) Para el paciente EC317 cuyo fenotipo de clase II es DR4/x, DQw3/x, se hallaron las siguientes cadenas: DQA1 0301 y DQB1 0302, responsables de formar una molécula con la especificidad DQw8 (Todd 1987).

3) Para el paciente EC361 cuyo fenotipo de clase II es DR5/8, DQw3/x, se hallaron las siguientes cadenas:

-DQA: El dominio polimórfico de los genes DQA1 de este individuo no pudo ser amplificado, aún luego de repetidas purificaciones del DNA genómico. Teniendo en cuenta que este individuo porta el alelo DQB1 0402 se presume que sea portador de una cadena DQA1 0401 (según datos de la literatura, dónde el alelo DQB1 0402 se lo halla acompañado por el alelo DQA1 0401, Bodmer 1990). Asimismo, es probable que la otra cadena DQA sea el alelo DQA1 0501, típico de los individuos DR5, DQw7 (DQw3).

-DQB: La amplificación de los genes DQB también fue deficiente, pero sin embargo se logró purificar suficiente material para subclonado y secuenciación. Se halló el alelo DQB1 0402, presente en el haplotipo DR8 y responsable de formar junto con la cadena DQA1 0401 la especificidad DQw4 (Gregersen 1986). Aunque no fue probado formalmente, es probable que este paciente tampoco pueda formar un dímero de riesgo DQw2, por carecer del alelo DQB 0201.

-DRB: El fenotipo serológico de este individuo fue confirmado por secuenciación las cadenas DRB presentes en el mismo. Encontramos las variantes DRB 1101 y DRB 0802 correspondientes a las especificidades HLA-DR5 y HLA-DR8.2 (variante del DR8) respectivamente (Bodmer 1990).

4) Para el paciente EC384 cuyo fenotipo serológico de clase II es DR5/4, DQw3, se hallaron las siguientes cadenas:

-DQA: La amplificación de los genes DQA fue deficiente, sin embargo

podimos caracterizar por secuenciación la cadena DQA1 0501 típica de la especificidad DQw7 del haplotipo DR5.

-DQB: Se caracterizó por secuencia la variante DQB1 0301 en desequilibrio de ligamiento con el alelo DR5. En lugar de encontrar una cadena DQB asociada al haplotipo DR4, hallamos una cadena DQB1 0603 en desequilibrio de ligamiento con el alelo DR6 y responsable de formar la variante DQw6 (Todd 1987). El dominio polimórfico de los genes DRB1 de este individuo no pudo ser amplificado, aún luego de repetidas purificaciones del DNA genómico. Por lo tanto no podemos descartar un error en la tipificación serológica (que el individuo en realidad sea DR5/6), o que la presencia de esta cadena DQB1 0603 se deba a la amplificación de algún otro DNA extraído en el laboratorio contaminado de la muestra de este paciente.

Por lo tanto, este paciente posee una cadena DQA de riesgo pero carece de la molécula DQB de riesgo.

En resumen, ninguno de estos individuos es potencialmente capaz de formar el dímero de riesgo DQA1 0501 DQB1 0201. Algunos de ellos portan una de las cadenas de riesgo pero no la otra. El paciente 317 carece de ambas.

Comparando la secuencia aminoacídica del dominio DQA polimórfico de los alelos DQA presentes en estos pacientes y en los pacientes heterocigotas DR3/8, DR3/4 y DR3/5 (Fig.24), podemos observar que estos comparten los mismos aminoácidos en las posiciones 18, 45, 48, 55, 61, 64 y 66. Estos aminoácidos también se encuentran en el alelo DQA 0501 de riesgo para la EC. Además, estos aminoácidos son distintos de los presentes en las mismas posiciones para los alelos DQA presentes en la especificidad DQw1 "protectora" para la EC.

Cuando comparamos las secuencias presentes en los alelos DQB hallados en nuestros pacientes, observamos que tienen en común una porción de la cadena entre los aminoácidos 84 al 90, la cual difiere de la secuencia presente en aquellas cadenas DQB responsables de la especificidad DQw1 (Fig.25).

Figura 24: Secuencias aminoacídicas comparadas de los dominios polimórficos entre las cadenas DQA "permissivas" (a) y "protectoras" (b) para la EC.

Alelos	Secuencia polipeptídica	Especif. HLA-DQw	Alelos HLA-DR asociados
a)			
	10      20      30      40      50      60      70      80      90		
DQA1 0201	SYGVNLYQSYGSPGQFTHEFDGDEEFYVDLERKETVMKLPFHRLRIFDPOFALTNIAVLKHNLNILIKRSNSTAATN	DQw2	DR7
DQA1 0501	-----Y-----Q-----G-----C--VLKQF-I-----S-----	DQw7, DQw2	DR5, DR14, DR3
DQA1 0301	-----YS-----Q-----R-F-R-----V-----	DQw9, 3, 4, 8, 7	DR9, DR4
DQA1 0401	-----Y-----Q-----G-----C--VLKQF-I-----T-----	DQw4	DRB.1, DRB.2
DQA1 0601	-----G-----G-----C--VLKQF-----T-----	DQw7	DRB.3
b)			
DQA1 0103	F-----Q-----K---A-RW-EFSKFGG---G--R-M--A-----M---	DQw1	DR15, DR13, DRB.3
DQA1 0101	-C-----F-----Y-----A-RW-E-SKFGG---G--R-M--A-----M--Y-----	DQw1	DR13, DR14, DR1
DQA1 0102	-C-----F-----Y-----Q-----A-RW-E-SKFGG---G--R-M--A-----M--Y-----	DQw1	DR6, DR13, DR15, DR5

Figura 25: Secuencias polipeptídicas correspondientes a los dominios polimórficos de las cadenas DQB. Comparación entre los alelos "permissivos" (a) y "protectores" (b) para la EC.

Alelos	Secuencia polipeptídica	Especif. HLA-DQw	Alelos HLA-DR asociados
a)			
	10      20      30      40      50      60      70      80      90		
DQB 0201	QFKGMCYFTNGTERVRLVSRSIYNREEIVRFDSVGEFRAVTLGLPAAEYMNQKIDILERKRAAVDRVCRHNYQLELRITL	DQw2	DR3, DR7
DQB 0301	---A-----Y-T-Y-----YA-----EVY---P-P-D-----EV---T--EL-T-----	DQw7(w3)	DR4, DR11, DR12, DR14, DR8
DQB 0302	-----T-Y-----YA-----P-P-----EV---T--EL-T-----	DQw8(w3)	DR4
DQB 0402	-----G-T-Y-----YA-----VY---P--RRLD-----ED--S--T-----	DQw4	DR4, DR8
DQB 0603	-----T-H-----YA-----VY---PQ-R-D-----EV--GT--EL-T-	DQw6(w1)	DR13
b)			
DQB 0501	---L-----G-T-H-----Y-----VY---PQ-R-V-----EV--GA--S-----EVAY-GI-	DQw5(w1)	DR1
DQB 0502	---L-----G-T-H-----Y-----VY---PQ-R-S-----EV--GA--S-----EVAY-GI-	DQw5(w1)	DR15
DQB 0503	---L-----G-T-H-----Y-----VY---PQ-R-D-----EV--GA--S-----EVAY-GI-	DQw5(w1)	DR14
DQB 0601	---A-----Y-T-Y-----D-----VY---PQ-R-D-----T--EL-T-----EVAF-GI-	DQw6(w1)	DR6, DR15
DQB 0602	-----Y-----YA-----VY---PQ-R-D-----EV--GT--EL-T-----EVAF-GI-	DQw6(w1)	DR15
DQB 0604	-----T-H-----YA-----VY---PQ-R-V-----EV---T--EL-T-----EVGY-GI-	DQw6(w1)	DR6, DR13
DQB 0303	-----T-Y-----YA-----VY---P-P-D-----EV---T--EL-T-----	DQw9(w3)	DR7
DQB 0401	-----L--G-T-Y-----YA-----VY-----RLD-----ED--S--T-----	DQw4	DR4

Como podemos observar en las Tablas 15 y 16, algunos cambios aminoacídicos en estas posiciones probablemente no introduzcan diferencias de importancia entre las conformaciones de las cadenas asociadas y no asociadas a la EC. Por ejemplo, el cambio de una leucina por una valina en la posición 85 de la cadena DQB: estos dos aminoácidos son no polares y los grupos que presentan no difieren mayormente en tamaño. Sin embargo, existen cambios que podrían ser relevantes tanto para la unión antigénica como para la interacción con el receptor T, ya que involucran la sustitución de un aminoácido polar con carga por otro aminoácido no polar (por ej.: posición 86 de la cadena DQB) o de un aminoácido portador de un grupo pequeño por otro portador de un grupo muy voluminoso (por ej.: en la posición 48 de la cadena DQA).

De acuerdo a la estructura espacial que adoptaría el bolsillo de unión y presentación antigénica de las moléculas de clase II (Brown 1988), podemos inferir la ubicación de estos aminoácidos y el rol de los mismos tanto en la interacción con el antígeno como con el receptor de los linfocitos T. Para la cadena DQA las posiciones que presentan cambios más relevantes entre alelos "permissivos" y "protectores" son la posición 61, que se encuentra en la fosa de unión antigénica, y las posiciones 64 y 48 involucradas en la relación de la molécula de histocompatibilidad con el receptor T (Fig.26). Como se puede observar en la Tabla 15, en la posición 61 hay un cambio de un aminoácido voluminoso y no polar como la fenilalanina por uno polar y pequeño como la glicina. En la posición 64 hay un cambio de un aminoácido polar sin carga como la treonina por uno polar con carga positiva como la arginina. En la posición 48 tanto en alelos "permissivos" como "protectores" se encuentran aminoácidos no polares, la diferencia radica en el tamaño de los residuos presentes en los mismos, ya que el de la leucina es pequeño mientras que el de el triptofano es voluminoso. El resto de los aminoácidos presentes en las posiciones 18, 45, 55 y 66 no presentan diferencias relevantes ni de carga ni de volúmen y los mismos se encuentran ubicados por fuera de los sitios de unión antigénica y del receptor T.

En la Tabla 16 se describen las diferencias existentes entre alelos DQB permissivos y protectores. Los aminoácidos presentes en las posiciones 85 y 86 participan en el sitio de unión antigénica, mientras

que los aminoácidos 84 y 88 participan en la interacción con el receptor T (Fig.26). Los cambios relevantes se encuentran en las posiciones 86 (un aminoácido polar con carga negativa como el ácido glutámico por un aminoácido no polar como la alanina) y 84 (un aminoácido polar sin carga como la glutamina por uno polar con carga negativa como el ácido glutámico). El cambio en la posición 84 podría afectar a posiciones adyacentes como es el caso de la posición 85 la cual no presenta diferencias relevantes entre estos alelos, pero se encuentra en el sitio de unión antigénica.

Diferencias de este tipo, tanto en el sitio de unión antigénica como en la zona de interacción con el receptor T pueden afectar profundamente la presentación antigénica y la respuesta inmunológica hacia un antígeno determinado, tal cual se demostró en numerosos modelos experimentales (Nathenson 1986).

En otras enfermedades autoinmunes asociadas al HLA se han hallado resultados similares con los descriptos para la EC. Las cadenas DQB de los alelos presentes en pacientes con miastemia gravis (Vartdal, 1989) presentan regiones comunes en el dominio polimórfico. Como ya se describió anteriormente el reemplazo de el aminoácido aspártico en la posición 57 de la cadena DQB presenta una fuerte asociación a la diabetes insulino dependiente (Todd, 1987).

Estudios funcionales de presentación de péptidos derivados de la  $\alpha$ -gliadina tanto con alelos asociados como protectores para la EC, permitirían ensayar la hipótesis recién planteada.

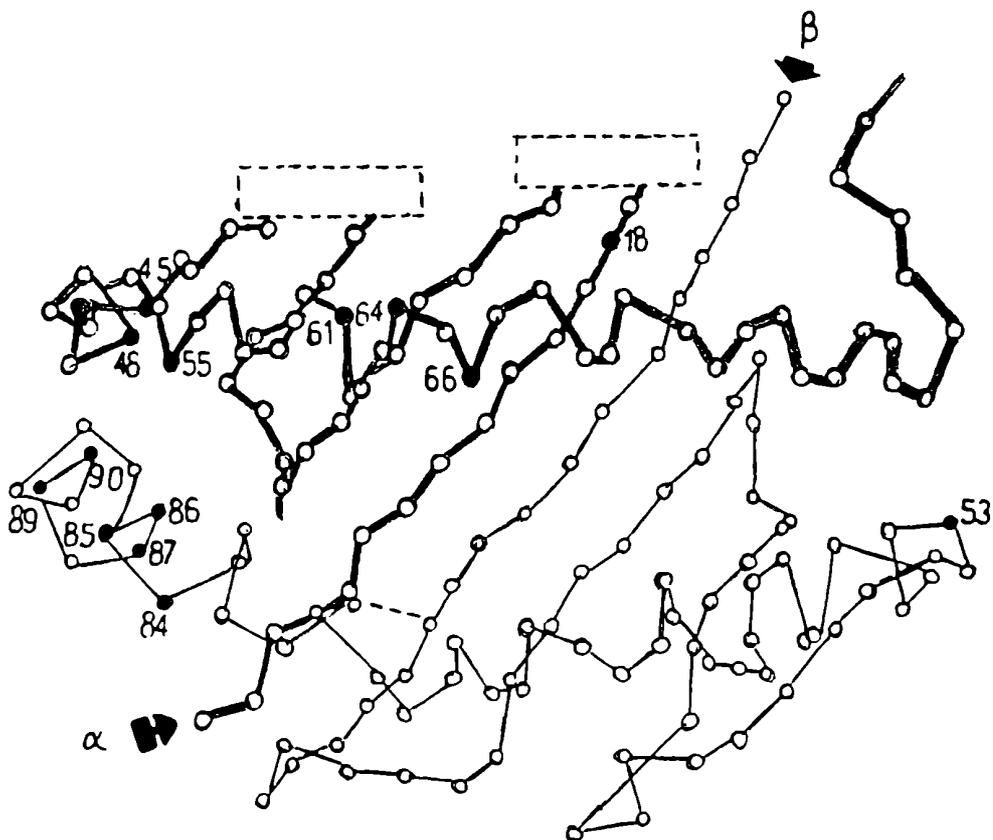
Tabla 15: Comparación entre los aminoácidos presentes en las posiciones 18, 45, 48, 55, 61, 64 y 66 en los alelos DQA "permissivos" y "protectores" para la EC. En paralelo se muestran las posiciones homólogas en la cadena  $\alpha$  de clase I. Las zonas hacia dónde se hallan dirigidos los residuos de estas posiciones son descriptas como p (sitio de unión antigénica), t (interacción con el receptor T), s (región de lámina  $\beta$ ) y h (región de  $\alpha$  hélice). El asterisco \* indica las posiciones en que las diferencias aminoacídicas son importantes entre alelos asociados y no asociados a la EC. NS indica aquellas posiciones que se hallan por fuera de las regiones antes mencionadas.

POSICION EN CADENA DQA	POSICION HOMOLOGA EN CADENA $\alpha$ DE CLASE I	ORIENTACION ALELOS PERMISSIVOS	AMINOACIDO EN ALELOS PROTECTORES	AMINOACIDO EN ALELOS PERMISSIVOS
18	13	NS	Ser (polar s/c)	Phe (no polar)
45	50	NS	Val (no polar)	Ala (no polar)
48	53	t *	Leu (no polar)	Trp (no polar)
55	59	s *	Arg (polar +)	Gly (polar s/c)
61	66	p *	Phe (no polar)	Gly (polar s/c)
64	69	t *	Thr (polar s/c)	Arg (polar +)
66	71	s	Ile (no polar)	Met (no polar)

Tabla 16: Comparación entre los aminoácidos presentes en las posiciones 53, 84, 85, 86, 87, 89 y 90 en los alelos DQB "permissivos" y "protectores" para la EC. En paralelo se muestran las posiciones homólogas en la cadena  $\alpha$  de clase I. Las zonas hacia dónde se hallan dirigidos los residuos de estas posiciones son descriptas como p (sitio de unión antigénica), t (interacción con el receptor T), s (región de lámina  $\beta$ ) y h (región de  $\alpha$  hélice). El asterisco \* indica las posiciones en que las diferencias de aminoácidos son relevantes.

POSICION EN CADENA DQB	POSICION HOMOLOGA EN CADENA $\alpha$ DE CLASE I	ORIENTACION	AMINOACIDO EN ALELOS PERMISSIVOS	AMINOACIDO EN ALELOS PROTECTORES
53	139	h *	Leu (no polar)	Gln (polar s/c)
84	169	t *	Gln (polar s/c)	Glu (polar -)
85	170	p	Leu (no polar)	Val (no polar)
86	171	p *	Glu (polar -)	Ala (no polar)
87	172	s *	Leu (no polar)	Phe/Tyr (no polar/polar s/c)
89	174	t	Thr (polar s/c)	Gly (polar s/c)
90	175	h *	Thr (polar s/c)	Tyr (polar s/c)

**Figura 26:** Esquema hipotético del bolsillo de presentación antigénica de las moléculas HLA-DQ. Los extremos NH<sub>2</sub> terminal de los dominios  $\alpha$ 1 (líneas finas) y  $\beta$ 1 (líneas gruesas) se encuentran señalados con flechas ( $\alpha$  y  $\beta$ ). Los círculos sombreados y los números muestran las posiciones correspondientes a los aminoácidos que difieren entre las cadenas "permisivas" y "protectoras" (adaptado de la referencia Brown 1988).



# CONCLUSIONES

## CONCLUSIONES.

Numerosos estudios en distintas poblaciones han demostrado la fuerte asociación de determinados alelos HLA de clase II a la enfermedad celíaca. Algunos alelos asociados varían según los distintos grupos étnicos. Sin embargo, hay consenso de una asociación predominante en a todas las poblaciones estudiadas hasta ahora. Esta es la concerniente al alelo HLA-DQw2: presente en más del 95 % de los pacientes celíacos (Mearin 1983, Scholz 1983, Palavecino 1989, Tosi 1983).

En este trabajo, para una población celíaca pediátrica argentina hemos confirmado la fuerte asociación del alelo DQw2 y procedimos a la caracterización molecular de las variantes alélicas de clase II asociadas. En particular, estudiamos a nivel molecular (RFLP, tipificación por oligonucleótidos y secuenciación) un grupo de pacientes heterocigotas DR5/DR7. Seleccionamos a los mismos en base a que sólo en los pacientes de poblaciones latinas se halló aumentada la frecuencia de este fenotipo. Los estudios por RFLP realizados en pacientes y controles DR5/DR7 no evidenciaron diferencias entre los mismos ni con los patrones descritos en el XWIH, que pudieran explicar el porqué de la presencia de este fenotipo asociado a la EC en latinos y no en sajones. Es por eso que procedimos a la secuenciación de los dominios variables de los alelos presentes en los genes que codifican para las cadenas HLA-DRB, -DQB y -DQA en pacientes portadores de este fenotipo. No se hallaron diferencias a nivel nucleotídico cuando se compararon los resultados con las secuencias publicadas en la bibliografía por estas poblaciones sajones. Por lo tanto, no existen diferencias (al menos en el dominio polimórfico) entre los alelos DR5, DQw3 y DR7, DQw2 presentes en individuos latinos respecto de los presentes en individuos sajones que expliquen la asociación diferencial a la EC. Los estudios llevados a cabo por secuenciación y por tipificación con oligonucleótidos específicos en todos los pacientes portadores del fenotipo DR5/DR7, muestran la presencia en todos ellos de las cadenas DQA1 0501 (presente en el haplotipo DR5) y DQB1 0201 (presente en el haplotipo DR7) capaces de formar por trans-asociación un dímero DQA/DQB de riesgo para la EC. Este sería exactamente idéntico al presente en todos los pacientes celíacos portadores del alelo HLA-DR3 (alelo descrito como de mayor riesgo a la EC en todas las poblaciones estudiadas). Es este dímero el

que se encuentra presente en el 95% de los pacientes celíacos argentinos, ya sea que estas cadenas estén codificadas en el mismo cromosoma o cada una en un cromosoma homólogo distinto, lo que nos lleva a pensar que la asociación primaria a la EC en nuestra población estaría relacionada a la presencia del mismo. En 1990, estudios de alloreactividad llevados a cabo con clones de linfocitos T capaces de reconocer la expresión del dímero DQA1 0501/DQB1 0201, confirmaron la presencia de este heterodímero en pacientes celíacos portadores del haplotipo HLADR5/7, DQw3/2 (Lundin 1990).

Esta asociación, no se observa en todas las poblaciones estudiadas. El hecho que haya poblaciones en que no exista asociación de la EC al fenotipo DR5/DR7 sugiere la existencia de otros factores, ya sean genéticos o ambientales, que contribuyen a la susceptibilidad. Incluso poblaciones étnicamente relacionadas, como la italiana (Colonna 1990) mostraron pacientes celíacos adultos con el alelo DR7 tanto en heterocigosis con DR3 y DR5, como un número de pacientes homocigotas para DR7. Estos pacientes portarían sólo la cadena DQB1 0201 pero no la cadena DQA1 0501. Esto habla en contra de la hipótesis del heterodímero de riesgo (al menos en esta población). En otras poblaciones se ha observado la presencia del alelo DR4 en aquellos pacientes celíacos negativos para DQw2. En estos pacientes tampoco se cumple la hipótesis antes planteada. En parte, los resultados pueden explicarse por la diferencia de la frecuencia con que estos alelos están presentes en la población normal en distintos grupos étnicos. Una explicación alternativa, aunque no incompatible con la anterior, es pensar en la existencia de polimorfismos en los genes variables del receptor T. Ya que los linfocitos T deben reconocer moléculas HLA para su activación, cambios en ciertas regiones variables en el receptor de linfocitos involucrados en la patogénesis correlacionarían con alelos HLA diferentes.

La caracterización molecular de los alelos DQA y DQB presentes en pacientes que no son portadores del dímero de riesgo, reveló la existencia de tramos en los dominios variables que son comunes a los presentes en las cadenas de riesgo DQA1 0501 y DQB 0201. Los alelos HLA-DQ que acompañan en heterocigosis a la molécula de riesgo DQw2, comparten homología en estos tramos con DQw2 y se comportan como alelos "neutros" o "permissivos". Además, comparando las secuencias entre estos

y las presentes en aquellos alelos DQA y DQB "protectores" para la EC (asociados a la especificidad DQw1), se observaron marcadas diferencias a nivel estructural. Por lo tanto, la hipótesis por nosotros planteada sería que estas secuencias cuando están presentes podrían jugar un rol "permisivo" para la EC; las secuencias presentes en las cadenas asociadas a la especificidad DQw1 conferirían protección a la EC. Esto explicaría en nuestra población el gran número de pacientes heterocigotas DR3/4, DR3/5 y DR3/8 (15 de 62) y el bajo número de pacientes heterocigotas DR3/1 (2 de 62).

Como ya mencionamos anteriormente, los dominios polimórficos de los alelos DQB asociados a diabetes insulino dependiente y esclerosis múltiple tienen en común uno o más aminoácidos, distintos de los presentes en aquellos alelos "protectores" o que no presentan asociación a estas enfermedades autoinmunes.

Respecto de la asociación de la EC a los alelos del locus DP existen grandes controversias. Los estudios de RFLP llevados a cabo en nuestro laboratorio para los genes DPA y DPB no mostraron correlación con los polimorfismos descritos como asociados a la EC en las poblaciones sajonas, aún cuando excluíamos los pacientes HLA-DR5/7. Se ha observado que en algunas poblaciones existe desequilibrio entre determinadas variantes del locus DP y los loci DQ y DR (Rosenberg 1989), aún cuando se consideraba que los alelos DP no presentaban este desequilibrio. Estos desequilibrios de ligamiento varían en las distintas poblaciones así como los alelos DP asociados a la EC.

En conclusión, la única asociación que presenta consenso en todas las poblaciones estudiadas es la concerniente al alelo HLA-DQw2. La mayoría de los pacientes son positivos para este alelo. Otras características, como la prevalencia de heterocigotas DR3/7 o DR5/7 o la asociación con determinados alelos DP, aún cuando en ciertos casos adquieren niveles significativos, no se hallan presentes en todas las poblaciones. De esta forma, la idea de un haplotipo extendido más que una asociación única de la EC a un determinado gen no explica porqué la asociación de la enfermedad al alelo HLA-DQw2 es constante en todas las poblaciones, mientras que las otras asociaciones varían de acuerdo a las condiciones de desequilibrio de ligamiento para cada población. La posibilidad de variaciones polimórficas en los genes variables del receptor T de los linfocitos involucrados en la patogénesis, constituye

otra explicación alternativa para estas observaciones.

Handwritten signature

Handwritten signature

# REFERENCIAS

- Anderson M., Bohme j., Anderson G., Moller E., Thorsby E., Rask L., Peterson P.A.; *Human Immunology* 11: 57-67, 1984.
- Angellini G. y col.; "Histocompatibility testing", ed. Albert E.D., Braur M., Mayr W.R., Springer Verlag, pp:582-584, 1984.
- Arnheim N., Strange C., Erlich H.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 6970, 1985.
- Arranz E., Blanco A., Alonso M.; *J. Clin. Nutr. Gastroenterol* 1: 291-295, 1986.
- Auffray y col.; *Immunogenetics* 26: 63, 1987.
- Bach F.H., Ohta N., Anichini A., Reinsmoen N.L.; "HLA class II antigens", ed. Solheim B.G. y col., Springer Verlag, pp: 249-265, 1986.
- Balkwill F.R., Burke F.; *Immunology Today* 10 (9): 299-303, 1989.
- Bell J.I., Todd J.A., Mc Devitt H.O.; *Immunobiology of HLA*, Springer Verlag 2: 40-48, 1987.
- Bell J.J., Denney D., Foster L., Belt T., Todd J.A., Mc Devitt H.O.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 6234-6238, 1987.
- Belt y col.; *Cell* 36: 907, 1984.
- Benoist C.O., Mathis D.J., Kanter M.R., Williams V.E., Mc Devitt H.O.; *Cell* 34: 169-173, 1983.
- Bentley y col.; *Immunogenetics* 22: 377, 1985.
- Betuel H., Gebuhrer L.; *Tissue Antigens* 15: 231, 1976.
- Bignon J.D., Semana G., Tiercy J.M., Simons M., Lalouel J.M., Cohen D.; *Immunobiology of HLA*, Springer Verlag 1: 851-860, 1987.
- Bjorkman P.J., Saper M.A., Samaraoui B., Bennet W.S., Strominger J.L., Wiley D.C.; *Nature* 329: 506-512, 1987.
- Bodmer J.G. y col.; *Human Immunology* 28: 326-342, 1990.
- Bodmer W.F.; *Histocompatibility Testing*: 11-12, 1984.
- Brautbar C., Freier S., Ashkenazi A.; *Tissue Antigens* 17: 313, 1981.
- Brown J.H., Jardetzky T., Saper M.A., Samataoui B., Bjorkman P.J., Wiley D.C.; *Nature* 332: 845, 1988.
- Bugawan T.B. y col.; *Journal of Immunology* 141: 4024-4030, 1988.
- Bugawan T.L., Angellini G., Larrick J., Auricchio S., Ferrara G.B., Erlich H.A.; *Nature* 339: 470-473, 1989.
- Bugawan T.L., Horn G.T., Long C.M., Mickelson E., Hansen J.A., Ferrara G.B., Angellini G., Erlich H.A.; *The Journal of Immunology* 141: 4024-4030, 1988.
- Charron D.J., Lotteau V., Turmel P.; *Nature* 132: 157-159, 1984.
- Chertkoff L.P., Herrera M., Mota A.H., Palavecino E., Fainboim L., Satz M.; *Human Immunology* 23 (4): 241-253, 1988.

- Chonczynski P., Sacchi N.; *Anal. Biochem.* 162: 156-159, 1987.
- Cohen D. y col; *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81: 1774, 1984.
- Cohen D., Cohen O., Marcadet A., Massart C., Lathrop M., Deschamps I., Hors J., Schuller E., Dausset J.; *Proc. Acad. Sci. USA* 81: 1774-1778, 1984.
- Cohen D., Simons M.J., Lalovel J.M., Dupont B.; *Immunobiology of HLA* 1: 67-71, 1989.
- De Marchi M., Borelli I., Olivetti E.; *Tissue Antigens* 14: 309, 1979.
- De Marchi, Carbonara C.; "HLA-DR3 and DR7 negative disease", *Histocompatibility Testing*, 1984.
- Didier B.K., Schiffenbauer J., Shuman S., Schwartz B.D.; *The Journal of Immunology* 137: 2637-2631, 1986.
- Dorn A., Bollekeus J., Staub A., Benoist C., Mathis D.; *Cell* 50: 863-872, 1987.
- Dorn A., Durand B., Morting C., Le Meur M., Benoist C., Mathis D.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 6249-6253, 1987.
- Dupont B. y col.; *Human Immunology* 26: 3-14, 1989.
- Dupont B., Oberfield S.E., Smithwick E.M., Lee T.D., Levine L.S.; *Lancet* ii: 1309-1312, 1977.
- Erlich H.A., Gillesen U.B.; *Human Immunology* 30: 110-118, 1991.
- Erlich H.A., Sheldon E.L., Horn G.; *Biotechnology* 4: 975-981, 1986.
- Erlich y col.; *Fed. Proc.* 43: 3025, 1984.
- Falchuck Z.M., Rogentine G.N., Strober W.; *Journal of Clinical Investigation* 52: 1602-1606, 1972.
- Feinberg A., Vogelstein A.P.; *Anal. Biochem.* 137: 266-267, 1984.
- Floremberg N.; *Immunobiology of HLA*, Springer Verlag 1: 62-66, 1989.
- Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., Erlich H.A.; *Science* 239: 487-491, 1988.
- Giles R.C., De Mars R., Chang C.C., Capra J.D.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 1776-1780, 1985.
- Gorski J., Mach B.; *Nature* 322: 67-70, 1986.
- Gregersen P.K., Moriuchi T., Karr R.W., Obata F., Moriuchi J., Maccari J., Goldberg D., Winchester R.J., Silver J.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 9149, 1
- Gregersen P.K., Todd J.A., Erlich H.A., Long E., Servenious B., Choi E., Kao H.T., Lee J.S.; *Immunobiology of HLA* 1: 1027- 1031, 1989.
- Gregersen y col.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 2642, 1986.
- Gromo G., Inverardi L., Geller L.R., Alter B., Bach F.H.; *Immunology Today* 8 (9): 259-261, 1987.

- Gustaffson y col.; Scand. J. Immunol. 19: 91-97, 1984.
- Gyllensten U.B., Lashkari D., Erlich H.A.; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 1835-1839, 1990.
- Gyllesten A., Erlich H.A.; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 9986, 1989.
- Hannahan; "DNA cloning" by D.M. Glover 1: 109, 1985.
- Hartzman R., Shaw S., Robbins F.M.; Histocompatibility Testing 1984 : 303-305, 1984.
- Helmuth R., Fildes N., Blake E., Luce M.C., Chimera J., Madey R., Gorodezky C., Stoneking M., Schmill N., Klitz W., Higuchi R., Erlich H.A.; American Jour of Human Genetics 47: 515-523, 1990.
- Herrera M., Chertkoff L.P., Palavecino E., Mota A., Guala M.C., Fainboim L., Satz M.L.; Human Immunology 26: 272-280, 1989.
- Hildig Nielsen J.J., Svejgaard A. y col.; Immunobiology of HLA, Springer Verlag 1: 867-881, 1987.
- Holbeck S.L., Nepom G.T.; Human Immunology 21: 183-192, 1988.
- Houghton A.N., Thomson T.M., Gross D., Oettgan H.F., Old L.J.; J. Exp. Med. 160: 225-269, 1984.
- Howell M.D., Austin R.K., Kelleher R., Nepom G.T., Kagnoff M.; J. EXP. Med. 164: 333, 1986.
- Howell M.D., Austin R.K., Kelleher R., Nepom G.T., Kagnoff M.; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 222, 1988.
- Inoko H., Tsuji K., Groves V., Trowsdale J.; "Immunobiology of HLA", vol II. En Immunogenetics and Histocompatibility, ed. Bo Dupont, Springer Verlag, p 83-86, 1989.
- Kagnoff M.F., Harwood J.I., Bugawan T.L., Erlich H.A.; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 6274-6278, 1989.
- Kaufman J.F., Auffray C., Korman A.J., Shackelford D.A., Strominger J.; Cell 36: 1-13, 1984.
- Kelly J., Weir D.G., Feighery C.; Tissue Antigens 29: 151-160, 1988.
- Keuming J., Pena J., van Leeuwen A.S.; Lancet 1: 506, 1976.
- Knowles R.K.; Immunobiology of HLA 1: 58-61, 1989.
- Kohler G., Milstein C.; Nature 256: 495-497, 1975.
- Kohonen Corish M.R.J., Serjeantson S.W., American Journal of Human Genetics 39: 751-762, 1986.
- Kohonen-Corish M.R.J., Serjeanson S.W.; Human Immunology 15: 263-271, 1986.
- Korman A.J., Boss J.M., Sorrentino R., Okada K., Strominger J.L.; Immunological Reviews 85: 45-86, 1985.
- Kvist S., Wiman K., Claesson L., Peterson P.A., Dobberstein B.; Cell 29: 61-69, 1982.

- Labrooy J.T., Hohmann A.W., Davidson G.P., Hetzel P.A.S., Johnson R.B., Shearman D.J.C.; *Clinical Experimental Immunology* 66: 661-668, 1986.
- Le Call I., Millaseau P., Dausset J., Cohen D.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 7836-7840, 1986.
- Lee B.S., Rust N.A., Mc Michael A.J., Mc Devitt H.O.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 4591-4595, 1987.
- Lee B.S.M, Rust N.A., Mc Michael A.J., Mc Devitt H.O.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84: 4591, 1987.
- Lee F.D., Toner P.G.; "Biopsy Pathology of the small intestine", ed. London, Chapman and Mall Ltd., 1980.
- Lee J., Trowsdale J., Travers P.J.; *Nature* 299: 750, 1982.
- Lee J.S.; *Immunobiology of HLA*, Springer Verlag 2: 49-60, 1987.
- Loft D.E., Marsh M.N., Crowe P.T.; *Lancet* 335: 1293-1295, 1990.
- Long y col.; *EMBO J.* 2: 389, 1983.
- Lundin K.E.A., Sollid L.M., Quigstad E., Markussen G., Ek J., Thorsby E.; *The Journal of Immunology* 145: 136-139, 1990.
- Maniatis T., Frisch E., Sambrook J.; *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbour Laboratory, 1982.
- Marsh S.G.E., Bodmer J.G.; *Immunology Today* 10 (9): 305-312, 1989.
- Mc Intyre K., Seidman J.; *Nature* 308: 551, 1984.
- Mearin M.L., Biemont I., Peña S.A., Polanco I., Vazquez C., Shreuder T.H., de Vries R.P.P., van Rood J.J.; *Gut* 24: 532, 1983.
- Meeuwse G.W.; *Acta Pediatr. Scand.* 59: 461, 1970.
- Milford E.L., Kennedy L.J., Yang S.Y., Dupont B., Lalove J.M., Yunis E.J.; *Immunobiology of HLA*, Springer Verlag 1: 37-38, 1989.
- Morellini M., Trabace S., Mazilli M.C., Lulli P., Capellaci S., Bonamicop M., Margarit I., Gandini E.; *Disease Markers* 6: 23, 1988.
- Morley y Campbell; *EMBO J.* 3: 153, 1984.
- Nathenson S.G., Geliebter J., Pfaffenbach G.M., Zeff R.A.; *Ann. Rev. Immunol.* 4: 471, 1986.
- Nepom B.S., Palmer J., Kim J., Hansen J.A., Holbeck S.L. Nepom G.T.; *Journal of Experimental Medicine* 164: 345-350, 1986.
- Nepom B.S., Schwartz D., Palmer J.P., Nepom G.T.; *Diabetes* 36: 114, 1987.
- Niven M., Caffrey C., Sachs J.A., Cassel P., Gallager R., Kurman P., Hitman G.; *Lancet* 2: 805, 1987.
- Palavecino E., Mota A., Awad J., Herrera M., Chertkoff L.P., de Rosa S., Satz M.L., Fainboim L.; *Comunicación al 13th Annual Meeting for Histocompatibilit and immunogenetics*, New York 1987.

- Palavecino E.A., Mota A.H., Awad J. , de Rosa S., Herrera M., Chertkoff L., Satz L. y Fainboim L.; *Disease Markers* 8: 5-10, 1990.
- Payne R.; *Arch. Inter. Med.* 99: 587-591, 1957.
- Preval C., Liwoska-G., Loche B., Griscelli M., Mach B.; *Nature* 318: 291-293, 1985.
- Radka S.F., Charron D.J., Brodsky F.M.; *Human Immunology* 16: 390-400, 1986.
- Rosenberg W.M.C., Wordsworth B.P., Jewell D.P., Bell I.J.; *Immunogenetics* 30: 307-311, 1989.
- Rotter J.I., Landlaw E.M.; *Clinical Genetics* 26: 529, 1984.
- Roux y col.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 6036, 1983.
- Sanchez-Perez M., Shaw S.; "HLA class II antigens", ed. Solheim B.G. y col., Springer Verlag, pp: 83-108, 1986.
- Scharf S.J., Horn G.t., Erlich H.A.; *Science* 233: 1070, 1989.
- Schiffenbauer J., Didier D.K., Rice K., Shuman S., Tieber V.L., Kittlesen D.J., Schwartz B.D.; *The Journal of Immunology* 139: 228-233, 1987.
- Scholz S., Albert E.; *Immunol. Rev.* 70: 77-88, 1983.
- Sejgaard y col.; "HLA and disease", *Immunology* 80, *Progress in Immunology* 4th Academic Press, London, 1980.
- Shaw S., Pollack M.S., Payne S.M., Johnson A.H.; *Human Immunology* 1: 177-185, 1980.
- Sheldon y col.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 9085, 1986.
- Sollid L.M., Markussen G., Ek J., Gjerde H., Vartdal F., Thorsby E.; *Journal of Experimental Medicine* 169: 345, 1989.
- Sood y col.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 616:78, 1981.
- Southern E.M; *J. Mol. Biol.* 98: 517, 1975.
- Spurkland A., Sollid L.M., Ronningen K.S., Bosnes V., Ek J., Vartdal F., Thorsby E.; *Human Immunology* 29: 157-165, 1990.
- Terasaki P.I., Mc Clelland J., Park M.S., Mc Kurdi B.; *Manual of Tissue Typing Technics*, eds. Ray J.G. y col., pp: 67-74, 1974 NIH, Bethesda.
- Tieber V.L., Abruzzini L.F., Didier D.k., Schwartz B.D., Rotwein P.; *Journal of Biological Chemistry* 261: 2738-2742, 1986.
- Tiwari J.L., Terasaki P.I.; "HLA and desease associations", ed. Springer Verlag, New York 1985.
- Todd J.A., Acha Orbea H., Mc Dermott M., Sinha A.A., Timmerman L., Steinman L., Mc Devitt H.O.; *Science* 240: 1003-1009, 1988.
- Todd J.A., Bell J.I., Mc Devitt H.O.; *Nature* 329: 599-604, 1987.
- Tonelle C., de Mars R. , Long E.O.; *Embo J.* 4: 2839, 1985.

- Tonelle C., de Mars R., Long E.O.; EMBO Journal 4: 2839-2847, 1985.
- Tosi R., Vismara D., tanigaki N., Ferrara G.B., Cicinara F., Buffolano W., Follo D., Auricchio S.; Clinical Immunology and Immunopathology 28: 395-404, 1985.
- Trowsdale J., Kelly A.; EMBO Journal 4: 2231-2237, 1985.
- Trowsdale J., Young J.A.T.; Immunological Reviews 85: 5-43, 1985.
- Trowsdale y col.; EMBO J. 4: 2231, 1985.
- Trucco M., Bal E. y col; Immunobiology of HLA, Springer Verlag 1: 860-876, 1987.
- Trucco M., Duquesnoy R.J.; Immunology Today 7 (10): 297-280, 1986.
- Tsuji K., Sato K., Nose Y., Inoko H., Nakatsuji T., Ando A., Ikewaki N.; HLA class II antigens, Springer Verlag : 154, 1986.
- Van Rood, Leeuwen A., Pleon J.S.; Nature 262: 295-297, 1976.
- White y col.; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 5111, 1986.
- Winchester R.J., Kunkel H.G.; Adv. Immunology 28: 221-285, 1980.
- Zoschke D., Segall M.; Human Immunology 15: 118-124, 1986.