

R. 19478

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
SECRETARIA GENERAL

Queda registrada esta Tesis Doctoral
al folio 42 número 162 del libro
correspondiente.

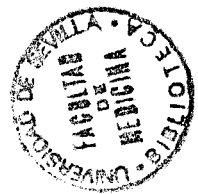
Sevilla, 15 OCT
El Jefe del Negociado de Tesis,

Flora Raffelle

TD / C 111

ESTUDIO COMBINADO DE MOLECULAS DE CLASE I Y II DEL COMPLEJO
MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD MEDIANTE TECNICAS DE MICROLINFO-
TOXICIDAD Y SECUENCIA ESPECIFICA DE OLIGONUCLEOTIDOS. SUS
APORTACIONES COMO INDICES DIAGNOSTICOS Y PRONOSTICOS EN LA
ENFERMEDAD DE BEHÇET.

6



Tesis presentada por M^a Jesús Castillo Palma para optar al
grado de Doctora en Medicina y Cirugía por la Universidad de
Sevilla.

X

Director: J. Sánchez Román

Codirector: M.F. González Escribano



Servicio Andaluz de Salud

GERENCIA PROVINCIAL

HOSPITAL UNIVERSITARIO "VIRGEN DEL ROCIO"

Avenida Manuel Siurot, s/n.

41013 - SEVILLA

JUNTA DE ANDALUCIA

Consejería de Salud

JULIO SANCHEZ ROMAN, Profesor Asociado del Departamento de MEDICINA de la Universidad de Sevilla, Jefe Clínico del Servicio de Medicina Interna del Hospital Universitario Virgen del Rocío.

COMUNICA :

Que la Licenciada D^a M^a. **JESUS CASTILLO PALMA**, ha realizado el trabajo de investigación que lleva por título: "**ESTUDIO COMBINADO DE LAS MOLECULAS DE CLASE I Y II DEL COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD MEDIANTE TECNICAS DE MICROLINFO-TOXICIDAD Y SECUENCIA ESPECIFICA DE OLIGONUCLEOTIDOS. SUS APORTACIONES COMO INDICES DIAGNOSTICOS Y PRONOSTICOS EN LA ENFERMEDAD DE BEHÇET**", bajo mi Dirección, reuniendo las condiciones para ser leída y defendida como tesis para optar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía.

Para que conste y a los efectos oportunos, expido la presente Comunicación en Sevilla a 29 de Septiembre de 1.993.



Fdo.: Dr. J. Sanchez Roman

DIRECTOR DE LA TESIS

Fdo.: M.J. Castillo Palma.

DOCTORANDO



Servicio Andaluz de Salud

GERENCIA PROVINCIAL

HOSPITAL UNIVERSITARIO "VIRGEN DEL ROCIO"

Avenida Manuel Siurot, s/n.

41013 - SEVILLA

JUNTA DE ANDALUCIA

Consejería de Salud

MARIA FRANCISA GONZALEZ ESCRIBANO, Doctor en Biología.

COMUNICA :

Que la Licenciada D^a M^a. **JESUS CASTILLO PALMA**, ha realizado el trabajo de investigación que lleva por título: "**ESTUDIO COMBINADO DE LAS MOLECULAS DE CLASE I Y II DEL COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD MEDIANTE TECNICAS DE MICROLINFO-TOXICIDAD Y SECUENCIA ESPECIFICA DE OLIGONUCLEOTIDOS. SUS APORTACIONES COMO INDICES DIAGNOSTICOS Y PRONOSTICOS EN LA ENFERMEDAD DE BEHÇET**", bajo mi Dirección, reuniendo las condiciones para ser leída y defendida como tesis para optar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía.

Para que conste y a los efectos oportunos, expido la presente Comunicación en Sevilla a 29 de Septiembre de 1.993.

Fdo.: Dra. M.F. González Escribano

CODIRECTOR DE LA TESIS

Fdo.: M.J. Castillo Palma.

DOCTORANDO

A mis padres, Valentín y Ana.

Aspectos parciales de este trabajo han sido presentados en la "IX Reunión de la Sociedad Andaluza de Medicina Interna" (Octubre de 1991); "VII Europea Conference of Histocompatibility" (Stressa, Marzo de 1993); VII Reunión Nacional del grupo Español Multicéntrico de las Uveitis y enfermedades Infecciosas", Madrid, junio de 1993; "XVI Congreso Español de Inmunología", Santander, mayo de 1993; "XVIII Congress of Rheumatology, ILAR-93", Barcelona, julio de 1993 y "Vth Prague Rheumatological Symposium", Praga, septiembre de 1993.

AGRADECIMIENTOS

Al Profesor Don Julio Sánchez Román, por su constante estímulo y generosa disponibilidad en el diseño, ejecución y dirección de este trabajo.

A la Dra. D^a María Francisca González Escribano, por su inestimable ayuda y dedicación en la realización y codirección de esta tesis.

Al Dr. Don Antonio Núñez Roldán, a la Dra. Ingeborg Wichmann y al resto de las personas del Servicio de Inmunología.

Al Dr. Don José Yélamos López que ha aportado los datos de moléculas de clase II en controles sanos.

A la Dra. D^a Francisca López Checa y al Dr. Don Tomás Rodríguez Cañas, así como a todos los componentes de sus respectivos Servicios de Oftalmología y Dermatología.

A todas y cada una de las personas (médicos, ATSS, auxiliares y administrativos) de la Consulta Externa y Planta de Hospitalización que contribuyen al funcionamiento de la Unidad de Colagenosis.

A Don José Antonio Contreras, por su valiosa colaboración en la búsqueda y aportación de bibliografía.

Por último, a Don Joaquín Castillo Palma y a D^a María del Mar Vasco Morcillo por su abnegada ayuda en los trabajos de impresión.

A todos ellos: muchas gracias.

INDICE

INDICE

Páginas

1.- INTRODUCCION 1

1.1.- ENFERMEDAD DE BEHÇET..... 2

 A) RECUERDO HISTORICO 2

 B) EL PROBLEMA DIAGNOSTICO..... 3

 C) EPIDEMIOLOGIA..... 7

 D) ETIOPATOGENIA..... 10

 E) ALTERACIONES INMUNITARIAS..... 11

 a) Inmunidad celular..... 11

 1. Linfocitos T..... 11

 2. Células NK..... 12

 b) Inmunidad humoral 13

 1. Linfocitos B..... 13

 2. Producción de anticuerpos 13

 c) Polimorfonucleares 14

 d) Linfoquinas 15

1.2.- EL COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD
(CMH) HUMANO 16

 A) ESTRUCTURA 17

 a) Estructura de las moléculas de clase I. 19

 b) Organización genómica de las moléculas
 de clase I 21

 c) Estructura de las moléculas de clase II 23

 d) Organización genómica de las moléculas
 de clase II 25

 B) POLIMORFISMO DE LOS PRODUCTOS DEL CMH 27

 a) Moléculas de clase I 27

 b) Moléculas de clase II..... 28

 1. Polimorfismo DR..... 28

 2. Polimorfismo DQ 29

 3. Polimorfismo DP 31

c)	Métodos utilizados para el estudio del polimorfismo	33
1.	Técnicas serológicas	33
2.	Técnicas de tipificación celular..	33
3.	Técnicas de tipificación bioquímica	34
4.	Técnicas de tipificación HLA a nivel molecular	34
C)	FUNCION DEL CMH	35
D)	EL CMH Y PREDISPOSICION A ENFERMEDAD	39
1.3.-	ASOCIACION ENTRE HLA Y ENFERMEDAD DE BEHÇET ..	41
2.-	OBJETIVOS	47
3.-	MATERIAL Y METODO	50
3.1.-	PACIENTES	51
3.2.-	TECNICAS DE LABORATORIO	52
A)	MICROLINFOTOXICIDAD	52
B)	OLIGOTIPAJE MEDIANTE PCR-SSO	56
a)	Extracción de ADN	57
1.	A partir de líneas celulares.....	57
2.	A partir de sangre periférica	57
b)	Amplificación de ADN por PCR	58
1.	Cebadores usados en la amplificación	58
2.	Mezcla de reacción	59
3.	Parámetros de los ciclos PCR	59
4.	Visualización del producto de amplificación	59
5.	Unión del ADN amplificado a membranas de nylon.....	60
6.	Sondas oligonucléicas.....	61
7.	Marcaje de las sondas.....	61
8.	Hibridación.....	64
9.	Lavados de astringencia.....	65
10.	Dotación inmunoológica de los híbridos	66
11.	Rehibridación de los filtros	67

3.3.- ANALISIS ESTADISTICO	68
A) COMPARACION DE PROCENTAJES	68
B) COMPARACION DE MEDIAS.....	68
C) ESTIMACION DEL RIESGO RELATIVO	68
4.- RESULTADOS	70
4.1.- DATOS EPIDEMIOLOGICOS.....	71
4.2.- DATOS CLINICOS	73
A) SINTOMATOLOGIA OCULAR	78
B) SINTOMATOLOGIA CUTANEA	82
C) SINTOMATOLOGIA ARTICULAR	84
D) SINTOMATOLOGIA NEUROLOGICA	85
E) SINTOMATOLOGIA DIGESTIVA	86
F) OTROS DATOS CLINICOS	88
4.3.- DATOS ANALITICOS	89
4.4.- MOLECULAS HLA	91
A) MOLECULAS CLASE I	91
a) Moléculas HLA-A	94
b) Moléculas HLA-B	95
B) MOLECULAS CLASE II	106
a) Moléculas DR	106
b) Moléculas DQB1	107
5.- DISCUSION	119
6.- CONCLUSIONES	132
6.1.- MOLECULAS DE CLASE I	133
A) MOLECULAS HLA-A	133
B) MOLECULAS HLA-B	133
6.2.- MOLECULAS DE CLASE II	134
7.- RESUMEN	136
8.- BIBLIOGRAFIA	142

RELACION FIGURAS

RELACION FIGURAS

	<u>Páginas</u>
Figura 1.- Ruta de la Seda	8
Figura 2.- Mapa Genético del Complejo Mayor de Histocompatibilidad humano	18
Figura 3.- Esquema general de la estructura de la molécula HLA-A2	20
Figura 4.- Estructura exón-intrón de los genes que codifican las moléculas HLA de clase I, los transcritos de ARNm, y la proteína.	22
Figura 5.- Esquema general de la estructura de la molécula HLA de clase II	24
Figura 6.- Representación de los genes que codifi- can las cadenas α y β de las moléculas HLA de clase II, los transcritos de ARNm y las proteínas	26
Figura 7.- Organización genómica de la subregión HLA-DR y los productos que codifica ...	30
Figura 8.- Complementación en trans, que conduce a la formación de moléculas híbridas HLA- DQ	32
Figura 9.- Representación esquemática de la inte- racción trimolecular entre una molécula HLA presente en la superficie de un célula presentadora de antígeno, el fragmento peptídico procedente del pro- cesamiento del antígeno, y el receptor de una célula T	36

Figura 10.- Prevalencia estimada de la EB en la provincia de Sevilla	72
Figura 11.- Curva actuarial del tiempo de afección ocular	81

RELACION TABLAS

RELACION TABLAS

	<u>Páginas</u>
Tabla 1. Prevalencia de EB y frecuencia de B51 en pacientes y controles en diversos países	42
Tabla 2. Cebadores usados para la amplificación del segundo exón de los genes DRB1 y DQB1	58
Tabla 3. Sondas oligonucleotídicas utilizadas en la asignación de alélos de DRB1	62
Tabla 4. Sondas oligonucleotídicas utilizadas en la asignación de alélos DQB1	63
Tabla 5. Esquema de aplicación del riesgo del cálculo relativo	69
Tabla 6. Datos epidemiológicos de 71 pacientes con EB	71
Tabla 7. Criterios diagnósticos utilizados en los 71 pacientes con EB	73
Tabla 8. Datos clínicos de todos los pacientes con EB	74
Tabla 9. Datos clínicos II: Porcentaje de las principales categorías de síntomas	77
Tabla 10. Síntomas al inicio de la enfermedad ...	77
Tabla 11. Patología ocular I: Datos epidemiológicos de los pacientes con patología ocular	79
Tabla 12. Patología ocular II: Lesiones oculares más frecuentes	80

Tabla 13.	Patología ocular III: Datos epidemiológicos de los pacientes con uveitis refractaria	82
Tabla 14.	Patología cutánea: Datos clínicos y epidemiológicos de pacientes con patología cutánea	83
Tabla 15.	Patología articular I: Articulaciones más frecuentemente afectadas	84
Tabla 16.	Patología articular II: Datos epidemiológicos de pacientes con patología articular	85
Tabla 17.	Patología neurológica: Datos clínicos y epidemiológicos de los pacientes con patología neurológica	86
Tabla 18.	Patología digestiva: Datos epidemiológicos de los pacientes con patología digestiva	87
Tabla 19.	Patología trombótica: Datos epidemiológicos de los pacientes con patología trombótica	88
Tabla 20.	Datos analíticos	90
Tabla 21.	Comparación de los títulos de serología de virus herpes y citomegalovirus frente a controles	91
Tabla 22.	Moléculas HLA de clase I y II de 67 pacientes con EB	92
Tabla 23.	Riesgo relativo conferido por moléculas HLA-A en pacientes con EB	94
Tabla 24.	Riesgo relativo conferido por moléculas HLA-B en pacientes con EB	95

Tabla 25.	Riesgo relativo conferido por B51 en pacientes con EB según las manifestaciones clínicas en relación a 223 controles ..	96
Tabla 26.	Riesgo relativo conferido por B51 en pacientes con EB y uveítis en relación a 223 controles	97
Tabla 27.	Diferencias clínicas y epidemiológicas entre los pacientes B51+ y B51-	99
Tabla 28.	Diferencias clínicas y epidemiológicas entre varones y mujeres B51+	100
Tabla 29.	Diferencias clínicas y epidemiológicas entre varones y mujeres B51-	101
Tabla 30.	Diferencias clínicas y epidemiológicas entre varones B51+ y el resto de los pacientes	102
Tabla 31.	Riesgo relativo conferido por moléculas HLA-A HLA-B en pacientes con EB estratificados por sintomatología	105
Tabla 32.	Riesgo relativo conferido por DRB1 genérico en pacientes con EB	107
Tabla 33.	Riesgo relativo conferido por DQB1 en pacientes con EB	108
Tabla 34.	Riesgo relativo conferido por la suma de alelos DQB1 que codifican DQ en pacientes con EB	109
Tabla 35.	Riesgo relativo conferido por DQB1 en pacientes con EB y uveítis refractaria.	110

Tabla 36.	Riesgo relativo conferido por DR o DQB1 en pacientes con EB estratificados por sintomatología	111
Tabla 37.	Frecuencia de alelos DRB1 (genérico) en pacientes con EB B51+ y controles B51+.	112
Tabla 38.	Frecuencia de alelos DQB1 en pacientes con EB B51+ y controles B51+	113
Tabla 39.	Frecuencia de la suma de alelos DQB1 en pacientes con EB B51+ y controles B51+.	114
Tabla 40.	Frecuencia de alelos HLA-II en pacientes y controles B51+ y B51-	116
Tabla 41.	Frecuencia de la suma de alelos de DQB1 que codifican DQ5 en pacientes y controles B51- Y B51+	117
Tabla 42.	Frecuencia de haplotipos DRB1*6-QB1*0501 en el grupo total de pacientes, en el grupo de uveitis y de uveitis refractaria con EB frente a controles	118

1. INTRODUCCION

1.- INTRODUCCION

1.1.- ENFERMEDAD DE BEHÇET

A) RECUERDO HISTORICO

Un dermatólogo turco, Hulusi Behçet, describió en 1937 (1) 2 pacientes que presentaban ulceraciones orales y genitales e iritis con hipopion. El primero presentó además eritema nodoso y su afección ocular evolucionó hasta la ceguera. Behçet realizó estudios histológicos y microbiológicos de las úlceras y, mediante técnica de Giemsa, descubrió cuerpos de inclusión por lo que interpretó el cuadro como de probable etiología virásica. En los tres años siguientes describió tres casos más y propuso una nueva entidad nosológica. Inicialmente la enfermedad no fue aceptada por todos ya que, recientemente, se habían descrito otros síndromes oculomucocutaneos (enfermedad de Reiter y síndrome de Steven-Jhonson), que también agrupaban úlceras genitales y afección ocular, y que se prestaban a confusión. Feigenbaun afirma que la descripción de la enfermedad de Behçet ya estaba referida por Hipócrates (2) y, antes de 1937, otros autores ya habían descrito esta triada (3,4,5) aunque la interpretaron como secundaria a diversas infecciones (estafilococia, tuberculosis o sífilis).

B) EL PROBLEMA DIAGNOSTICO

Posteriormente, junto a la triada clásica (completa o incompleta) se añaden rasgos de participación multisistémica: neurológica (Berlín, 1944), articular (Admantiades, 1949), vasculitis cutanea (Touarine, 1941), tromboflebitis (Adamantiades, 1946), arteritis de grandes vasos con o sin la formación de aneurismas (Fakuda, 1977), y ulceraciones intestinales (Baba, 1976). La descripción inicial del fenómeno de patergia (aparición de un pústula o pápula horas después de practicar una punción en la piel) hecha por Bobner en 1937 (6) sigue planteando controversia ya que su metodología no está estandarizada y su frecuencia varía mucho según la zona geográfica (7).

El substrato histológico de la mayoría de las lesiones es una vasculitis de pequeño vaso, de predominio linfocitario, pero absolutamente inespecífica donde la necrosis fibrinoide y la leucocitoclasia no siempre son llamativos. Hamza lo describe como "...infiltrado polimorfo, de predominio linfocitario o neutrófilo, de disposición perivascular, que se acompaña de turgencia o proliferación endotelial que obstruye completa o incompletamente la luz vascular, y que a veces se acompaña de necrosis fibrinoide que afecta las arteriolas" (8).

Pronto se puso de manifiesto que la triada completa no estaba siempre presente y, en un número importante de casos, era difícil establecer el diagnóstico ya que se trata de una enfermedad multisistémica en la que los síntomas cardinales pueden estar separadas por años, que suele ser atendida por diferentes especialistas, y que carece de datos biológicos o histológicos específicos. Como en tantas otras enfermedades de esta naturaleza, se recurrió a distintos sistemas de criterios diagnósticos. No hay acuerdo acerca de cual es el más adecuado. En fecha muy reciente se ha llegado a establecer uno nuevo con mayor especificidad y sensibilidad (9) que los demás pero, según veremos después, hay autores que tampoco lo aceptan como el mejor.

Mason y Barnes (10), en 1969, propusieron el primer esquema recurriendo a un sistema de criterios mayores y menores. Los mayores comprendían lesiones cutáneas además de la triada clásica, y los menores aquellas otras lesiones que se habían ido describiendo como frecuentemente asociadas a la EB (digestivas, tromboflebitis, cardiovasculares, artritis, afección del sistema nerviosos central). Entre estos últimos también se incluyó, como criterio, la existencia de historia familiar de EB ya que, progresivamente, se había descrito un número creciente de casos con agregación familiar (Sezer, 1956 y 1960 y Fowler et al. 1968, citados en referencia 10).

Los autores postulaban que el diagnóstico podía establecerse con la presencia de tres criterios mayores, o de dos mayores y dos menores.

En 1976 O'Duffy y Goldstein descubrieron una incidencia importante de afección neurológica en la EB (11) y piensan que la mayoría de las manifestaciones tiene el mismo peso a la hora de establecer el diagnóstico, siempre que vayan acompañados de aftosis oral recidivante. Así, el diagnóstico quedaría establecido con tres manifestaciones de las que ellos consideran más frecuentes (aftas orales, aftas genitales, uveítis, vasculitis cutánea, sinovitis y meningoencefalitis) siempre que una de ellas fuera la aftosis recidivante. Son los primeros autores en introducir el concepto de formas incompletas, que serían aquellas con solo dos manifestaciones (una de ellas, obligadamente, la aftosis oral recidivante). Son tajantes a la hora de establecer exclusiones previas: enfermedad inflamatoria intestinal, lupus eritematoso sistémico, enfermedad de Reiter e infecciones herpéticas.

El esquema más complejo de diagnóstico es el que elaboró el "Behçet's Disease Research Committee of Japan" en 1979 (12). Introduce, por primera vez, el fenómeno de patergia como prueba específica aislada dentro de las manifestaciones cutáneas y, siguiendo a Mason y Barnes, establece los mismos



criterios mayores y menores, añadiendo a estos últimos la epididimitis. Así mismo se diferencia entre diagnóstico completo, cuando están presentes los 4 criterios mayores, incompleto, si hay 3 mayores (ó solo 2, si uno de ellos es la afección ocular), probable solo con 2 mayores y posible con uno mayor.

Touraine, en 1941 (13), se plantea un enfoque más práctico de la enfermedad de Behçet considerando que la aftosis oral y genital es una manifestación mucosa de una enfermedad sistémica. Considera tres grupos dependiendo de la extensión de las manifestaciones: **aftosis mucosa aislada** (oral y genital), **aftosis mucocutanea**, si se añaden manifestaciones cutaneas a las anteriores, y **aftosis generalizada** si coexisten manifestaciones oculares, neurológicas, articulares o viscerales. Lehner (14), en esta misma línea, agrupa a los pacientes según el tipo de manifestaciones, planteándose que pueden tener una base inmunopatológica y pronósticos distintos. Establece 4 categorías de EB: **Tipo mucocutaneo**, **Tipo artrítico**, **Tipo neurológico** y **Tipo ocular**.

En 1985, en una conferencia internacional sobre enfermedad de Behçet, se intenta establecer un sistema unitario sin llegar a un acuerdo. Finalmente, en 1990, el "International Study Group for Behçet's Disease" (9) establece un nuevo sistema de criterios, con sensibilidad del 91,95% y especifi-

cidad del 96,98%. Vuelve a limitarse, prácticamente, a la triada clásica más las manifestaciones cutaneas. No se contemplan las manifestaciones menores (digestivas, articulares, neurológicas ni tromboflebitis) porque, según los autores, no tienen valor discriminativo. Sin embargo, se incluye el fenómeno patérgico como elemento diagnóstico aislado dándole el mismo valor que a la uveitis, las úlceras genitales o a las manifestaciones cutaneas. Algunos autores ponen en duda la validez de esta última prueba, al menos en algunas zonas geográficas donde la frecuencia de su respuesta positiva es baja (7,15). Por otro lado, la técnica no está estandarizada y no se hace mención a ninguna metodología concreta en su elaboración en el mencionado sistema de criterios. Solo se dice explícitamente que se considera positiva solo si aparece una pústula.

C) EPIDEMIOLOGIA

Como puede verse, casi 60 años después de la descripción inicial de la EB, sigue existiendo una importante inseguridad diagnóstica, lo que conlleva una difícil estimación de su verdadera incidencia y de su epidemiología. Los datos disponibles permiten establecer una incidencia notablemente alta en una faja que se extiende entre los 30 y 40° latitud norte, discurre por Europa paralela al Mediterraneo, atraviesa Asia por el Norte de la India y llega hasta el Japón. Esta zona corresponde a la tradicional **Ruta de la Seda** (figura 1),

La "Ruta de la Seda"

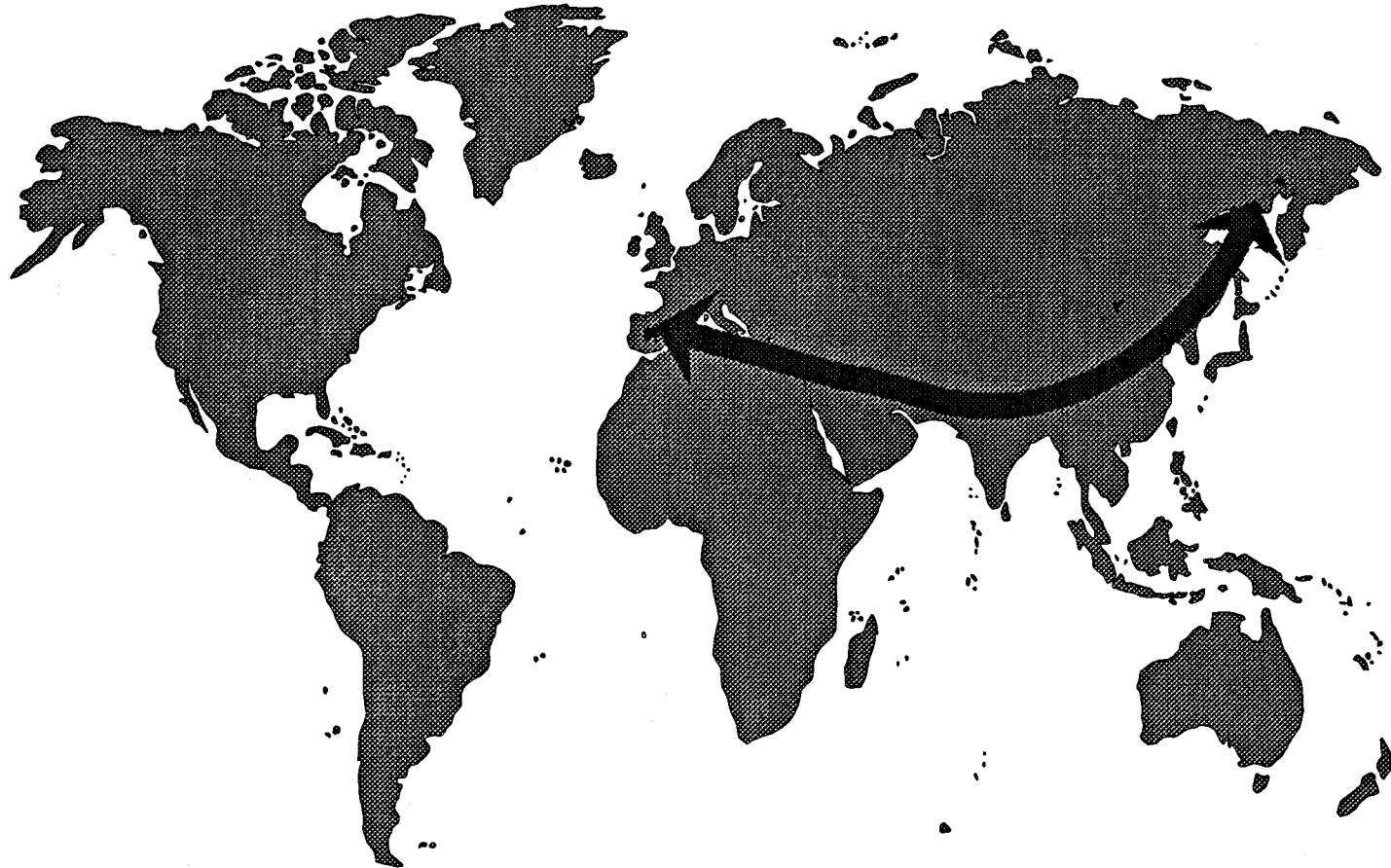


Figura 1 . - Ruta de la Seda

utilizada durante siglos por las caravanas en sus desplazamientos Este-Oeste. Hay también diferencias en la distribución por sexos y de la edad de inicio en los países de mayor y menor incidencia y también en la distribución y gravedad de las manifestaciones. Así, en el Japón y en la cuenca mediterránea, donde existe la incidencia mas alta, la enfermedad predomina en varones y en edades más tempranas siendo en estos países una de las primeras causas de ceguera. Por el contrario en los países de menor incidencia predominan las mujeres y aparición de la enfermedad en edades más tardías (16).

La etiopatogenia de la enfermedad e Behçet es desconocida. Se sabe que existen casos familiares en de EB aunque en la mayoría de las grandes series no llega al 2 % (17). Desde los estudios de Ohno en 1972 se conoce la mayor frecuencia de HLA-B5 (18) (en realidad de su subtipo B51) en los pacientes con EB. Sobre todo en los países donde la frecuencia de este alelo es alta en la población general. Fue este autor quien interpretó que esta peculiar distribución geográfica, a lo largo de la Ruta de la Seda, era debida a un origen étnico común de la población nómada que la atravesó durante siglos. No obstante, el factor genético no es suficiente: en estos países hay una alta incidencia de HLA-B51 y la mayoría de los portadores de este alelo no sufren la enfermedad. Además pueden existir notables diferencia de la incidencia dentro de

cada país: mayor en el Norte que en el sur del Japón (20). Otro dato importante es que los japoneses que emigran a los EEUU no sufren la enfermedad (21). También se supone que influyen factores hormonales ya que la enfermedad tiene un perfil distinto entre ambos sexos (8).

D) ETIOPATOGENIA

Parece evidente que existen factores ambientales desencadenantes que son imprescindibles para que se desarrolle la enfermedad, probablemente condicionados por el factor geográfico. Hay datos experimentales que apoyan el que agentes infecciosos y sustancias inorgánicas puedan estar implicados en la etiopatogenia de la EB. Sin embargo estos agentes no actuarían como tóxicos directos sino induciendo alteraciones inmunológicas, en sujetos con una determinada dotación genética, que desencadenarían la enfermedad.

En los pacientes con EB se han encontrado datos que van a favor de una relación o dependencia con infección por virus herpes simple tipo I (VHS-1). Tienen, con mayor frecuencia que los individuos sanos, inmunocomplejos específicos para dicho virus (22); se han detectado, con técnicas de hibridación, homólogos de material genético de VHS-1 en los leucocitos de los pacientes (23,24); se ha comprobado una respuesta celular alterada de los linfocitos CD4 y CD8 frente a antígenos del VHS-1 (25), y, mediante técnicas serológicas, se ha

encontrado una mayor frecuencia de títulos elevados de anti-VHS-1 en pacientes con EB que en la población control (26). Hamza encuentra una mayor frecuencia de HBsAg en una población de 50 pacientes con EB que en pacientes control (8). Publicaciones recientes (27) hacen referencia a la posible relación entre antígenos estreptocócicos y enfermedad de Behçet objetivándose una mayor producción de IL-6 por parte de linfocitos T de los pacientes con EB que en los controles, frente a antígenos estreptocócicos (28). Quizás otros antígenos bacterianos podrían tener efectos similares.

E) ALTERACIONES INMUNITARIAS

El mecanismo lesional también es desconocido. Los datos experimentales ponen de manifiesto una serie de alteraciones inmunológicas muy variadas, a veces contradictorias, y que resumimos a continuación:

a) Inmunidad celular

1.- Linfocitos T: Desde el punto de vista cuantitativo hay una disminución de células T-helper circulantes que condiciona el descenso del cociente de células circulantes CD4/CD8 (8). Mediante cultivo mixto de linfocitos, Sakane, en 1982, ya sugería la existencia de un descenso de helper de supresores como causa fundamental de la disminución de CD4 (29). Palmarés, en 1991, (30) demostró, en distintos tipos de uveítis, especial-

mente en la de la EB, que el descenso de células T4 depende de helper de supresores (CD45RA+, 2H4+)CD4+ y no de helper de inductores (CD29+4B4+). Este autor encuentra, además, incremento de CD8.

Cualitativamente se ha demostrado una débil respuesta a mitógenos mientras que, paradójicamente, existe una respuesta fuerte a antígenos de mucosa bucal fetal en fase de aftosis que, sin embargo, es débil en fase de inactividad (31). La producción de interferón gamma presenta variaciones importantes que dependen de la fase en que se estudien: Ohno (32) comprobó incremento de γ -IFN (y de su enzima inducido, 2'-5'-oligoadenilato sintetasa) en la fase de actividad. Las variaciones de γ -IFN, según se trate de fases de actividad o de convalecencia pueden tener importantes repercusiones sobre la actividad de células NK (33).

2.- Células NK: Hamzaoui KH et al. (34) demuestran igualmente disminución de células NK durante las fases de actividad con posterior aumento en la convalecencia. También durante la fase de actividad, contribuyendo a la citada disminución del cociente CD4/CD8, hay un incremento de la fracción Leu7-OKT8 que se supone corresponde a células NK inmaduras. En dicho trabajo (34) se menciona la disminución de la actividad de las células

NK en pacientes con enfermedades agudas por herpesvirus (concretamente para VEB), variaciones observadas también paralelamente en la EB lo que, en cierto modo, habla a favor de una etiología viral en este proceso.

b) Inmunidad humoral

1. Linfocitos B: En la EB hay una activación policlonal de los linfocitos B con incremento de la producción de inmunoglobulinas (35) y de crioglobulinas: Lehner comprueba esto último en el 64% de 60 pacientes (36). En cuanto a los niveles de inmunocomplejos circulante los resultados contradictorios. En nuestra serie comprobamos hipergammaglobulinemia solo en el 8 % e incremento en los niveles de crioglobulinas en el 16,32 % de los pacientes.

2.- Producción de anticuerpos: Se ha descrito, de forma inconstante, incremento de anticuerpos antirretina pero se piensa que puede tratarse simplemente de un marcador de la enfermedad (37). Durante las fases agudas se detectan anticuerpos antimucosa oral pero son inespecíficos y aparecen en cualquier tipo de aftosis (38). Se han encontrado ANA a títulos bajos en 6 % de los pacientes (39); en nuestra serie son positivos en el 40 % (20 % si se considera el límite inferior en 1/40). Se han estudiado también los títulos de anticuerpos contra di-

versos glicolípidos pero los resultados son contradictorios. Los que van dirigidos contra los gangliósidos que contienen ácido siálico (presentes en las membranas de las neuronas) están elevados en los pacientes con neuro-Behçet cuando se comparan con los niveles que se encuentran en otros procesos autoinmunes que afectan al sistema nervioso central (lupus eritematoso y esclerosis múltiple) (40). En algunas series se ha encontrado algunos pacientes con un título elevado de anticuerpos anti-citoplasma de neutrófilos con técnica de inmunofluorescencia indirecta (41) pero la frecuencia suele ser baja; rara vez se obtiene significación estadística. También se han encontrado anticuerpos anticardioplipina elevados en algunas series (42,43) en distinta proporción pero con frecuencias bajas, y solo en algunos de ellos con cierta significación estadística. Algunos autores no encuentran relación con patología venosa pero si con la vasculitis retiniana (43).

c) Polimorfonucleares

Muestran incremento de la capacidad de migración, índice de fagocitosis y producción de superóxido (44). Se cree que todo ello depende de un factor sérico que es inhibido por la colchicina (45). Efthimiou (46) encuentra un aumento de la migración leucocitaria, mediante estudio de ventana cutánea, en pacientes con EB activa y Aoki (47) comprueba elevación de

medulasina (serín proteasa de los granulocitos), en los casos de EB en actividad, que se normaliza en fases de remisión. Muniain (48) demuestra un incremento en la actividad de los polimorfonucleares que es paralela a la presencia de reacción patérgica.

d) Estudios de linfoquinas

Los resultados son contradictorios. Hemos comentado que el IFN está normal, aumentado o disminuido en distintos según el momento evolutivo de la enfermedad (IFN) (32). La producción de IL-2 por los linfocitos de los pacientes con EB es normal. Parece existir una disminución de los receptores de IL-2, tanto por disminución de linfocitos que los exhiben como por la disminución de densidad de los mismos en su superficie (49). La IL-1 y la IL-2 aumentan en humor acuoso y en el vítreo en los pacientes con uveítis (50).

Aunque se supone que la base de la enfermedad es un fallo en los mecanismos reguladores de la inflamación, resulta difícil integrar todos estos aspectos parciales, aportados por la investigación inmunológica, para intentar esclarecer cual es su verdadera responsabilidad en el desarrollo lesional del proceso. Lo más probable es que la aparente divergencia traduzca, en realidad, la existencia de estadios evolutivos diferentes en relación con alteraciones inmunitarias cambiantes. Por otra parte los distintos

mecanismos no afectarían de forma homogénea a todos los órganos afectados. Así, para Hamza (8), mientras el sustrato inmunopatológico en el eritema nodoso, la artritis, la uveítis anterior y la afección del SNC parece ser la respuesta humoral mediada por los complejos inmunes (hipersensibilidad tipo III), en la aftosis, en las lesiones cutáneas papulopustulosas y en el fenómeno patérgico estarían más bien implicados la actividad citotóxica directa y el aumento de quimiotaxis de los granulocitos. Incluso en un terreno limitado, como es el ojo, la agresión que da lugar a la uveítis posterior es distinta de la que se relaciona con uveítis anterior. En la primera dominan los mecanismos de inmunidad celular (infiltrado de linfocitos T) (50) mientras que en la segunda, como vimos, lo hacen los de inmunidad humoral (probablemente por fallo de las células helper de supresores) (30).

1.2.- EL COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD HUMANO

En los últimos 30 años se ha avanzado mucho en el conocimiento del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH); tanto en lo que se refiere a su estructura como en lo relativo a su importante función en el control de la respuesta inmune (51-53). Desde la descripción de la asociación entre la presencia de HLA-B27 y de espondiloartritis seronegativas (54), a principios de la década de los 70, se ha

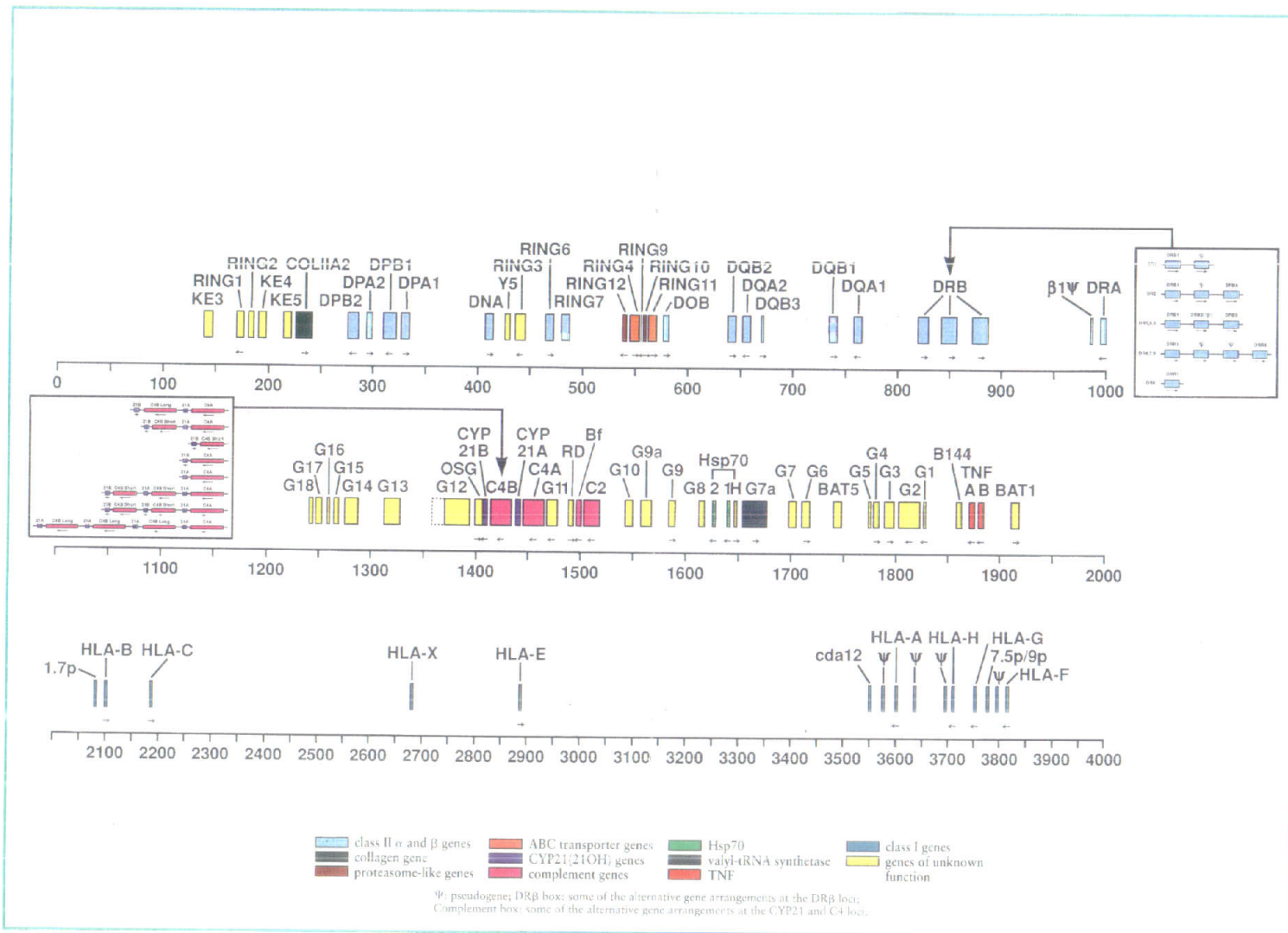
profundizado específicamente acerca del papel que el CMH pueden tener en el desencadenamiento de distintas enfermedades, especialmente en la esfera de la patología sistémica.

A) ESTRUCTURA

El Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC), que en el hombre se denomina sistema HLA, está constituido por diversos genes, estrechamente unidos, localizados en el brazo corto del cromosoma 6 (Figura 2) (55). Estos genes codifican moléculas proteicas con función clave en las respuesta inmune y están caracterizados por un marcado polimorfismo alotípico (variabilidad entre individuos de la misma especie). Los genes de A, B y C codifican las moléculas de clase I; los genes DR, DQ y DP codifican las moléculas de clase II; y los genes de los C2, BF, C4A, C4B, 21-OHA y 21-OHB codifican las moléculas de clase III (66). Además, los genes que codifican el factor de necrosis tumoral y la linfotoxina ($TNF\alpha$ y $TNFB$, respectivamente) (70) y dos genes que codifican la proteína de shock por calor (HSP) estan tambien localizados en esta región.

De cada gen existen varios **alelos** (formas alternativas de un gen). Algunos epitopos (determinates antigénicos) son compartidos por varias moléculas o antígenos (proteína codificada por el gen correspondiente) y se les denomina **epitopos**

Figura 2 .-- Mapa genético del Complejo Mayor de Histocompatibilidad humano (Trosdale et al., (55))



públicos o supertípicos, pero cada molécula tiene sus epitopos propios que las distinguen de las demás.

Los genes HLA están estrechamente ligados en el cromosoma y por lo general se heredan juntos como una unidad (**haplotipo**). Determinados alelos de cada gen muestran una clara tendencia para asociarse con determinados alelos de otros genes, fenómeno que se conoce como **desequilibrio de asociación**. Por tanto, determinados haplotipos se encuentran con una frecuencia mayor de la esperada en la población y muestran una clara variación en las distintas etnias.

a) Estructura de las moléculas de clase I

En la figura 3 se representa esquemáticamente la estructura general de una molécula de clase I. Se encuentran en todas las células nucleadas del organismo. Son moléculas heterodiméricas formadas por una cadena pesada α , unida de forma no covalente a una cadena ligera, la β_2 microglobulina. La cadena α , variable, está codificada por el sistema HLA pero la β_2 microglobulina (que por el contrario, posee una estructura constante) está codificada por un gen ajeno al CMH y localizado en el cromosoma 15 (56). La cadena α tiene tres porciones, una intracelular, otra transmembrana y otra extracelular (57). La estructura primaria de esta última se divide en tres dominios α_1 , α_2 y α_3 (la α_3 está unida a la porción transmembrana). El dominio α_3 es similar en su estructura

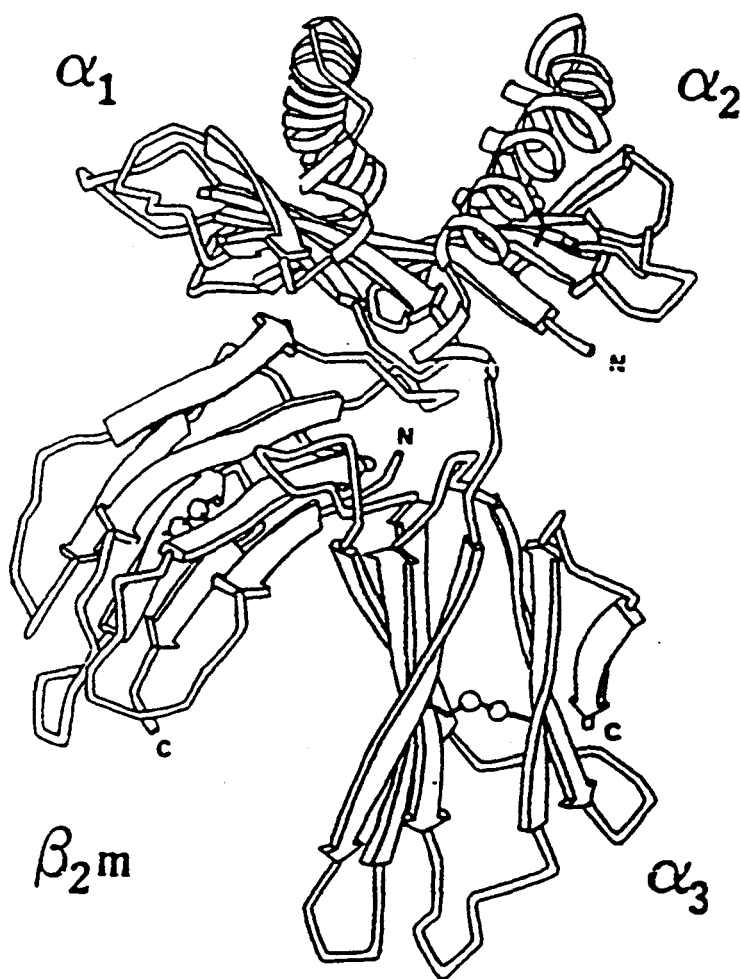


Figura 3.- Esquema general de la estructura de la molécula HLA-A2 (Bjorkman et al., 1987 (137)).

terciaria a la $\beta 2$ microglobulina y entre las dos se establece una interacción no covalente. Los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ contienen 2 residuos de cisteína involucrados en la formación de un puente disulfuro intracatenario; en esta localización es donde radica la mayoría de las diferencias entre las distintas moléculas y donde se establece la interacción con los antígenos extraños (58). En función de esta organización en dominios se consideran a las moléculas de clase I miembros de la familia de las inmunoglobulinas (Igs), que comprende un conjunto de proteínas que comparten una estructura común, cuya unidad básica es un dominio globular con las características de los dominios de las Igs (59).

b) Organización genómica de la región HLA de clase I

En la figura 4 está representada la disposición de los genes que codifican las moléculas HLA de clase I (60). Los genes HLA-A, B y C codifican para proteínas asociadas a la $\beta 2$ microglobulina que son los productos definidos serológicamente como moléculas HLA-A, B y C. Los genes HLA-E, F, y G codifican proteínas que se asocian también a la $\beta 2$ microglobulina pero con patrones de expresión diferentes de los de las moléculas HLA de clase I clásicas (61, 62). Así mismo existe un número indeterminado de pseudogenes de clase I que no originan ningún producto asociado a la $\beta 2$ microglobulina (63-65).

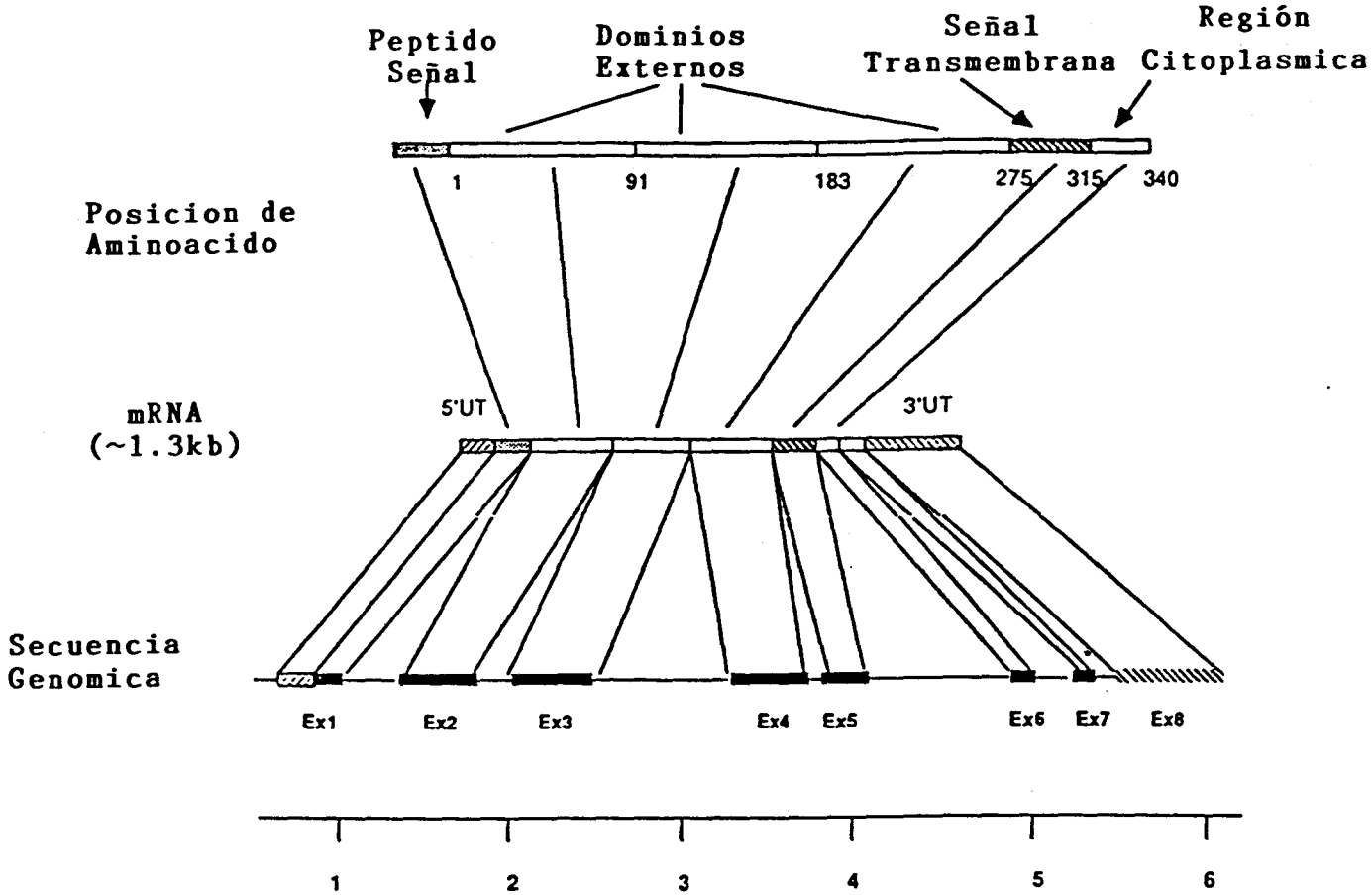


Figura 4 .- Estructura exón-intrón de los genes que codifican las moléculas HLA de clase I, los transcritos de ARNm, y la proteína. La gradación en kilobases (kb), representada en la parte inferior de la figura, sólo se refiere a la secuencia genómica; el ARNm no está dibujado a escala Ex representa los exones, mientras que 5'UT y 3'UT representan las regiones no traducidas (Robinson y Kindt, 1989 (60)).

Actualmente se conoce la secuencia de algunos genes que codifican para moléculas de clase I (66-71). Hay 8 exones separados por 7 intrones (figura 4). El primer exón codifica para 21-24 aminoácidos que no están en la proteína expresada en la membrana, los exones 2, 3 y 4 codifican, respectivamente, los dominios α_1 , α_2 y α_3 . El exón 5 codifica el péptido que conecta la región extracelular con la parte que atraviesa la membrana y el propio péptido transmembrana y los exones 7, 8 y 9 codifican la región intracitoplásmica; el último exón contiene el segmento 3' del gen que no se traduce (61).

Una de las características más sobresalientes del MHC, como ya hemos mencionado, es su extremado polimorfismo (72). La mayoría de las diferencias conocidas entre las secuencias de aminoácidos se hallan localizadas en 6 segmentos: 3 en el dominio α_1 , otras dos en el dominio α_2 y una en la zona que separa α_2 de α_3 . Por el contrario la estructura del dominio α_3 tiende a permanecer constante.

c) Estructura de las moléculas de clase II

Son glicoproteínas heterodiméricas constituidas por una subunidad α y otra β , unidas de forma no covalente (figura 5). Ambas tienen tres porciones, una intracelular, otra transmembrana y otra extracelular, y están codificadas por genes de la región HLA. La porción extracelular se divide en dos dominios, α_1 y α_2 , y β_1 y β_2 respectivamente.

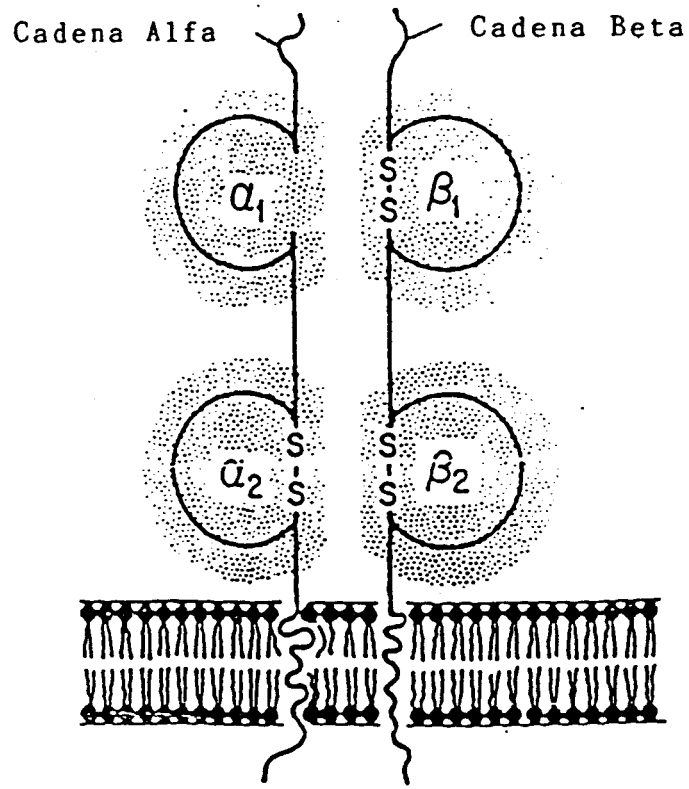


Figura 5 .- Esquema general de la estructura de la molécula HLA de clase II. S-S representa un puente disulfuro.

Los dominios $\alpha 2$ y $\beta 2$, proximales a la membrana, tienen una estructura semejante a la porción constante de la superfamilias de las inmunoglobulinas por lo que se las considera miembros de esta superfamilia (73). Se expresan solo en las células procesadoras de antígenos (monocitos-macrófagos fundamentalmente), linfocitos B y linfocitos T estimulados. La expresión de los productos del MHC en la membrana celular se potencia por la acción de las moléculas de interferón (IFN) (el IFN- γ induce, fundamentalmente la expresión de moléculas de clase II mientras que el IFN α/β induce de forma preferente las de clase I). En determinadas circunstancias, el IFN- γ tiene la capacidad de inducir la expresión de estas moléculas en algunos tejidos donde habitualmente no se expresan (células epidérmicas, endoteliales, tiroideas, musculares o renales) circunstancia que parece tener mucha importancia en el desarrollo de respuestas autoinmunes.

La mayor parte de las diferencias en las secuencias de aminoácidos entre las moléculas de clase II se concentra en los dominios $\alpha 1$ y $\beta 1$.

d) Organización genómica de la región HLA de clase II

La región del sistema HLA que codifica las moléculas de clase II se llama HLA-D (figura 6) (60). Estos genes codifican cadenas α y β y están agrupados en subregiones que se disponen a distancia creciente del centrómero en el siguiente

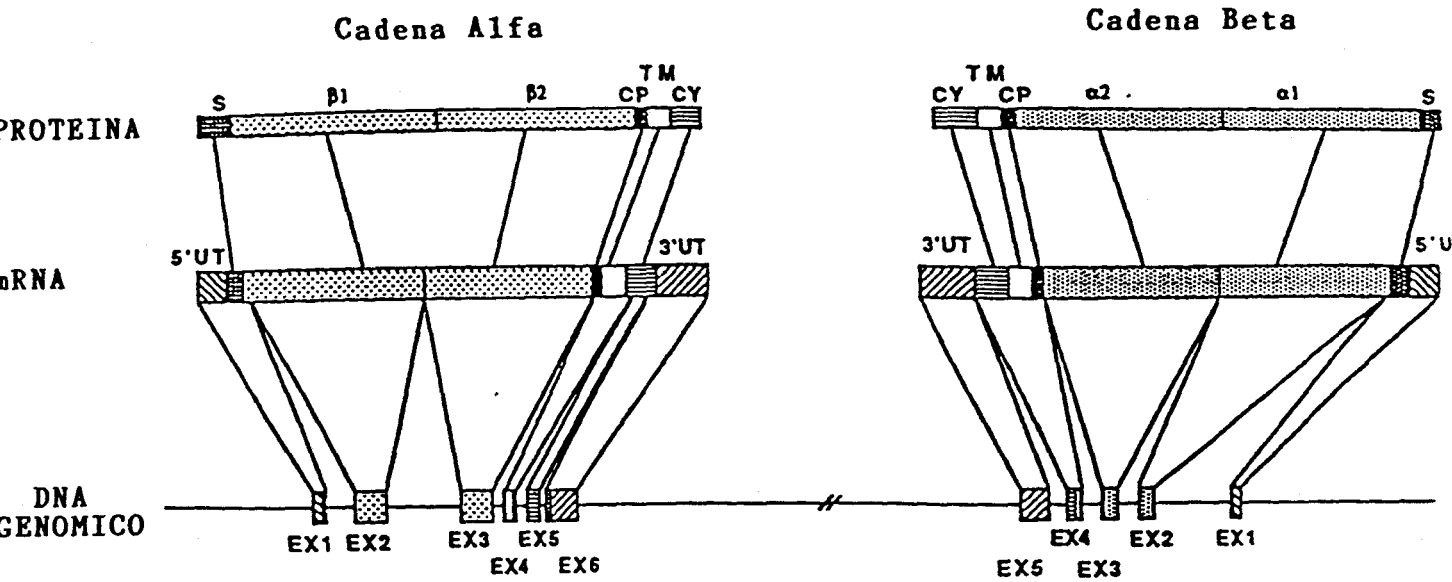


Figura 6 .- Representación de los genes que codifican las cadenas α y β de las moléculas HLA de clase II, los transcritos de ARNm y las proteínas. Se representa el péptido señal, EX los exones, 5'UT 3'UT las regiones no traducidas, CP el péptido de conexión, TM la región transmembrana y CY la porción intracitoplásmica (Robinson y Kindt, 1989 (60)).

orden: DP, DN, DO, DQ y DR. Codifican las moléculas de clase II DP, DQ y DR respectivamente. DN (contiene un gen solo para cadena α) y DO (contiene solo un gen para cadena β) no codifican ningún producto proteico y se comportan como seudogenes (74-78).

Los genes que codifican la cadena β estan repartidos en 6 exones y los de la cadena α en 5. Los dominios extracelulares de ambas cadenas son codificados por el segundo y tercer exón (60).

B) POLIMORFISMO DE LOS PRODUCTOS DEL CMH

a) Moléculas de clase I

En el caso de las moléculas de clase I, el estudio de las secuencias de aminoácidos que se conocen hasta ahora, ha permitido establecer que esta variabilidad está limitada a los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ y distribuída según 6 regiones hipervariables. Es suficiente la sustitución, en ellas, de un aminoácido, para determinar diferencias radicales en la significación de estas moléculas (72).

Para el locus de las moléculas de clase I el mayor polimorfismo reside en HLA-B, seguido de HLA-A. Las moléculas HLA-C tienen menos alelos y difieren en un número menor de aminoácidos. El dominio $\alpha 1$ de estos últimos antígenos está muy conservado, lo que contrasta con la gran di-

versidad de esta región en las moléculas de clase I A y B. Este fenómeno, junto con el bajo nivel de expresión de HLA-C, disminuye el papel funcional de estas moléculas.

Otra característica de las moléculas de clase I es el alto grado de reactividad cruzada (79), que viene determinada por el hecho de que distintas moléculas pueden compartir epitopos idénticos o muy similares. La existencia de epitopos compartidos (epitopos públicos) permite asociar a los distintos antígenos que los comparten en grupos especiales. Se han definidos 7 grupos: tres para moléculas HLA-A y cuatro para HLA-B. En algunos casos, se ha podido establecer la topografía de algunos de estos epitopos dentro de la molécula. Se ha descrito un sistema dialélico Bw4/Bw6 que divide a los antígenos HLA-B en dos grupos según contenga uno u otro epitopo.

b) Moléculas de clase II

El polimorfismo de las moléculas de clase II es aún mayor y es una de las características intrínsecas de estas moléculas. Es expresión de la peculiar organización genómica de la región HLA-D.

1.- Polimorfismo DR: Los productos de de la subregión DR son muy polimórficos y este polimorfismo se expresa exclusivamente en las cadenas β . Existe un solo gen que

codifica para la cadena α (DRA) que es constante (al menos desde el punto de vista funcional) (78), y un número variable de genes para la cadena β (DRB). Los genes DRB son altamente polimórficos en secuencias (72), así como en el número y formas alélicas presentes en diferentes haplotipos (figura 7). Existen 5 genes que codifican la subunidad β y en cada uno de ellos hay descritos varios alelos. Del gen B1 se conocen 18 especificidades serológicas definidas por la cadena β 1 y se expresa siempre. Las diferencias en las secuencias de las diferentes cadenas β se concentran en el dominio β 1 distribuidas en tres regiones distintas situadas entre los aminoácidos 9-13, 25-28, y 67-74 (80).

2.- Polimorfismo DQ: las especificidades serológicas DQ se hallan en desequilibrio de asociación con los diferentes tipos de antígeno DR. Existen dos genes para codificar cadenas α y otros dos para cadenas β : A1, A2, B1 y B2 (A2 y B2 se comportan como pseudogenes) (81). Las especificidades serológicas de DQ están relacionadas con el polimorfismo de la cadena DQ β salvo DQ1 que también está relacionada con la cadena DQ α . Existe un fuerte desequilibrio de asociación entre los alelos de DQ y DR.

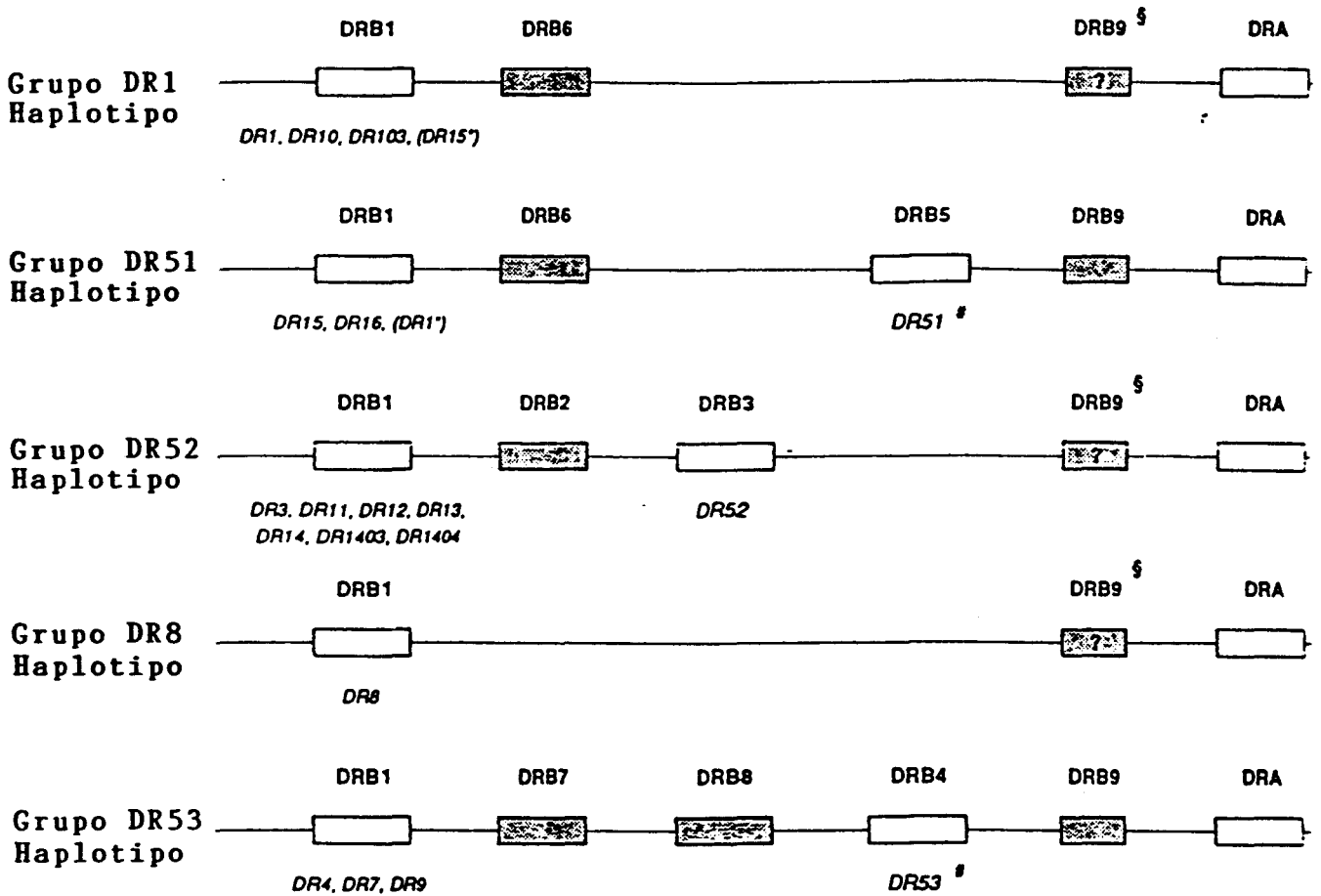


Figura 7.- Organización genómica de la subregión HLA-DR y los productos que codifica. Los pseudogenes están representados por zonas rayadas y los genes expresados por zonas blancas. La especificidad serológica codificada por un gen se muestra debajo de cada uno de ellos. *Haplotipos observados raramente. #DR51 y DR53 pueden no ser expresados en ciertos haplotipos. §La presencia de DRB9 en estos haplotipos necesita ser confirmada (Bodmer et al., 1992 (72)).

Además del polimorfismo individual de las cadenas DQ α y DQ β existe una diversidad adicional fruto de la asociación de las cadenas α y β pertenecientes a diferentes haplotipos (82). De esta forma, en un individuo heterocigoto pueden expresarse 4 productos DQ distintos: los formados por cadenas α y β del mismo haplotipo (asociación "cis" y las formadas por cadenas α y β de distinto haplotipo (asociación "trans") (figura 8).

3.- Polimorfismo DP: En la subregión DP también hay dos genes DPA y dos DPB aunque solo se expresan los productos de los genes DPA1 y DPB1 (83). Hasta ahora no se han podido definir serológicamente las especificidades DP y se han definido mediante reacciones de linfocitos sensibilizados. Las nuevas técnicas de biología molecular han puesto de manifiesto el alto grado de polimorfismo de los genes DPA1 y DPB1.

El mecanismo de generación del polimorfismo de los antígenos HLA se desconoce pero existen en este sistema condiciones específicas favorecedoras del mismo: existencia de múltiples "loci" muy relacionados y gran número de alelos para cada "locus". Característicamente las diferencias estructurales suelen ser múltiples, aunque agrupadas en zonas variables, y por lo general, la va-

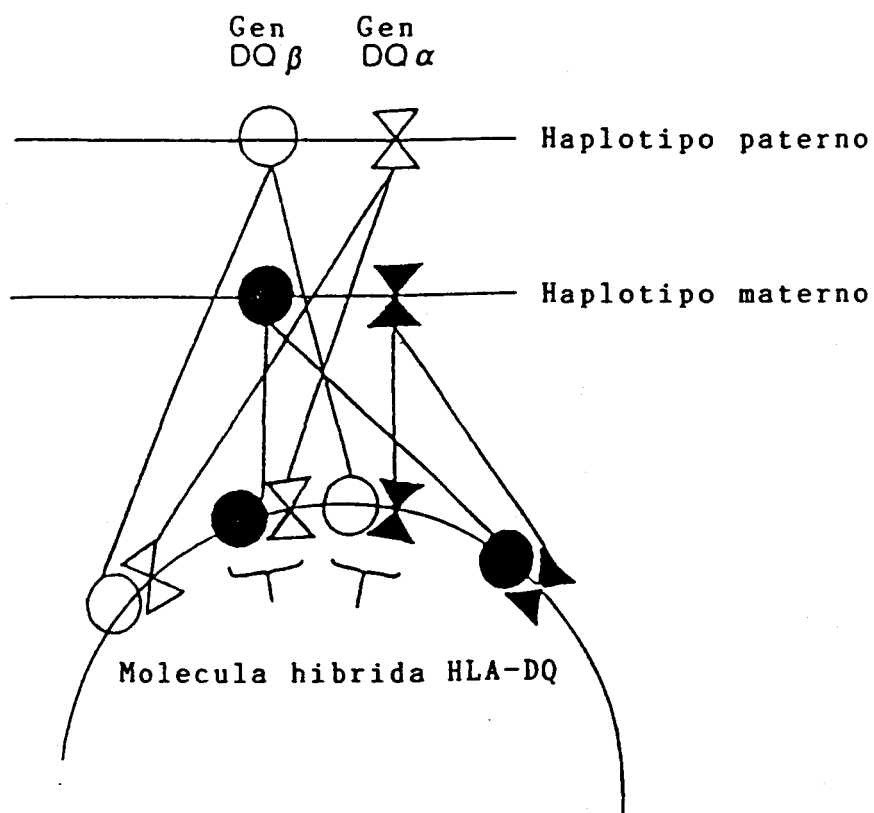


Figura 8 .- Complementación en trans, conduciendo a la formación de moléculas híbridas HLA-DQ (Charron, 1990 (139)).

riabilidad de cada posición está restringida a escasos aminoácidos diferentes.

c) Métodos utilizados para el estudio del polimorfismo

1.- Técnicas serológicas: El polimorfismo de los productos génicos HLA fué estudiado inicialmente por métodos serológicos (leucoaglutinación (84) y actualmente por linfotoxicidad dependiente de anticuerpo (85)). Estos métodos consisten en el reconocimiento de epitopos presentes en las moléculas HLA por anticuerpo aloespecíficos (monoclonales o policlonales). Por lo general se usan aloantisueros obtenidos de mujeres multíparas que han desarrollado anticuerpos frente a los antígenos HLA codificados por el haplotipo paterno de sus hijos. Los métodos serológicos presentan limitaciones importantes que afectan fundamentalmente a la definición de algunos subtipos de DQ, algunos subtipos de DRB1 (especialmente DR4 y DR6) y algunos alelos de DP. Estas limitaciones son consecuencia de los fenómenos de reactividad cruzada y del desequilibrio de asociación.

2.- Técnicas de tipificación celular: El segundo paso fueron los métodos basados en la tipificación celular. Consisten en pruebas "in vitro" basadas en el cultivo mixto de linfocitos (MLC) en las cuales los linfocitos de una persona (respondedor) son cultivados con leucoci-



tos (irradiados o tratados con mitomicina C para evitar su proliferación) de otra persona (estimulador). Los linfocitos T del respondedor proliferaran si las células estimuladoras presentan antígenos HLA incompatibles, especialmente antígenos de clase II controlados por la región HLA-D. De esta forma se establecieron las diferentes especificidades HLA-Dw (86). Existen técnicas más depuradas en esta misma línea (cultivo con linfocitos sensibilizados (TLS) que han permitido definir determinantes celulares asociados a HLA-DR y la identificación del sistema HLA-DP (87).

3.- técnicas de tipificación bioquímica: Existen diversas técnicas de tipificación bioquímica que por lo general requieren marcaje radioactivo de las proteínas celulares y posterior inmunoprecipitación con un anticuerpo monoclonal específico (88). Son especialmente útiles para detectar variantes bioquímicas que se han definido serológicamente.

4. Técnicas de tipificación de HLA a nivel molecular: Finalmente, la aplicación de la metodología de la genética molecular al estudio del polimorfismo HLA ha conducido a la aparición, en los últimos años, de varias técnicas para la tipificación HLA a nivel molecular. La técnica inicial de tipificación HLA-ADN fue la determina-

ción de la variación en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) (89) pero posteriormente se han desarrollado nuevos métodos de tipificación HLA-ADN, todos ellos basados en la amplificación, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), de segmentos de ADN que codifican las porciones más polimórficas de las moléculas HLA. Hasta ahora se han descrito las siguientes técnicas: tipificación con oligonucleótidos específicos se secuencia (PCR-SSO) (90), PCR-RFLP (91), amplificación con cebadores específicos de secuencia (PCR-SSP) (92)

C) FUNCION DEL CMH

El CMH juega un papel clave en la presentación y reconocimiento de antígenos por parte de linfocitos T. Estos solo reconocen epitopos antigénicos en forma de péptidos unidos a moléculas HLA presentes en las membranas de las células presentadoras de antígenos (figura 9) (93). Estas células presentadoras de antígeno procesan la molécula antigénica hasta obtener fragmentos peptídicos que son "presentados" por moléculas de clase I y II (94). A raíz de la resolución de la estructura cristalina de una molécula de clase I (HLA-A2) (58) se ha podido conocer mejor la forma en que se presentan los aloantígenos. En los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ los aminoácidos se disponen con una configuración α helicoidal que sirve de pared

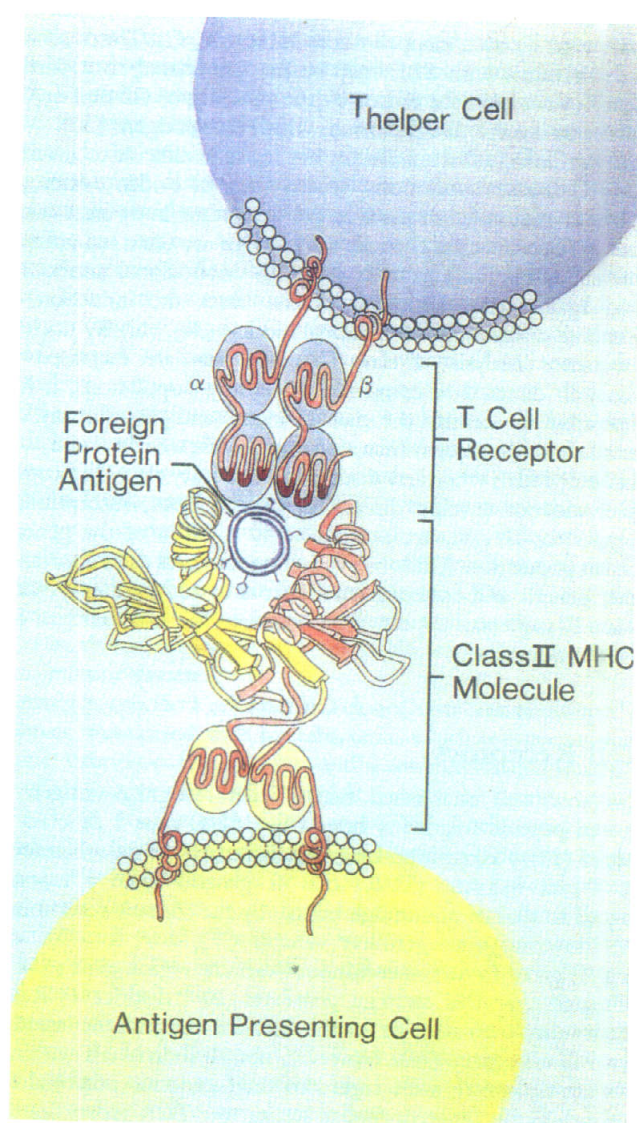


Figura 9 .- Representación esquemática de la interacción trimolecular entre una molécula HLA presente en la superficie de una célula presentadora de antígeno, el fragmento peptídico procedente del procesamiento del antígeno, y el receptor de una célula T (Sinha et al., 1990 (93)).

a la "hendidurda" o "pliegue", zona donde se realiza la unión con el antígeno. La mayoría de las regiones hipervariables están en la "hendidura". La localización de las zonas hipervariables está relación tanto con el reconocimiento del antígeno como con la interacción con los receptores de los linfocitos T citotóxicos.

No se conoce la estructura tridimensional de las moléculas HLA de clase II pero se ha sugerido un modelo hipotético por homología con las moléculas de clase I (95). Se supone que hay dos α hélices paralelas, una perteneciente a la cadena α y otra a la β , con puentes entre ellas, con disposición beta-plegada, para formar la "hendidura" en donde se establecería la union con el antígeno. Existen tres zonas hipevariables en el dominio de la cadena β , uno en la "pared" y dos en la "hendidura".

Esta presentación es distinta para antígenos intracelulares y para los antígenos solubles. En el caso de los antígenos intracelulares se requiere que el antígeno, una vez procesado por la célula hasta obtener la porción antigénica del mismo, sea expuesto en su superficie unido a las moléculas de clase I CMH. Los linfocitos T citotóxicos (CD8) solo reconoceran al antígeno si son presentados en unión con antígeno de histocompatibilidad de clase I (94).

Los antígenos solubles son procesados por la célula presentadora de antígeno y exhibidos en unión con las moléculas de clase II de su superficie. Los linfocitos T cooperadores (CD4) solo reconocerán aquellos antígenos presentados por moléculas de clase II (95). La reacción inmune es, entonces, menos directa que en el caso anterior.

Las moléculas de clase I y II establecen una restricción en la capacidad de respuesta de los linfocitos limitando esta a los antígenos que van presentados junto con moléculas que previamente se han reconocido como propias. El antígeno procesado presenta una afinidad determinada por las estructuras expuestas en la "hendidura" de las moléculas tanto de clase I como II previamente descritas.

Cambios cualitativos o cuantitativos en la expresión de estos antígenos del CMH pueden influir en la presentación del antígeno y por tanto regular la cantidad o cualidad de la respuesta inmune. La capacidad de los antígenos HLA para exponer de distinta forma sustancias extrañas determina la capacidad y la forma de responder frente a las mismas. Este fenómeno, que depende del fenotipo HLA, es el responsable de la diversidad de respuesta inmune entre los individuos y condiciona, al menos en parte, su susceptibilidad y predisposición frente a determinadas enfermedades (54).

D) CMH Y PREDISPOSICION A ENFERMEDAD

Se supone que, en la mayoría de las enfermedades sistémicas, existen factores ambientales y genéticos que cooperan para inducir y perpetuar una respuesta inflamatoria inadecuada. Por otro lado, en la mayoría de ellas, se describe agregación familiar y concordancia (aunque no absoluta) en gemelos. En los últimos años se han relacionado algunas de las moléculas del CMH con más de 100 enfermedades. La mayor frecuencia de determinado antígeno, aislado o en asociación, en grupos de personas afectas de determinada enfermedad con respecto a la población normal hizo surgir el concepto de riesgo relativo (RR), expresado por la fórmula de Woolf (96). Un RR mayor de 2 confiere una mayor probabilidad de padecer la enfermedad, y un RR menor de 1 confiere una asociación negativa con respecto a la misma.

Cualquier hipótesis para explicar esta asociación tendría que explicar también el hecho de que la gran mayoría de las personas que, siendo portadoras del mismo antígeno, no padecen la enfermedad (no existe hasta ahora ninguna asociación absoluta entre antígeno de histocompatibilidad y enfermedad). Dado que se trata de un sistema caracterizado por el polimorfismo y, sobre todo para las moléculas de clase I, por las reacciones cruzadas, hay muchas razones teóricas para que esta relación no sea absoluta:

- Varios antígenos, clásicamente implicados con el desarrollo de determinadas enfermedades, tienen varios subtipos conocidos (siete para B27, y cinco para DR4) y puede que la asociación se establezca solo con un determinado subtipo.

- Las enfermedades suelen ser heterogéneas en cuanto a intensidad y tipo de sintomatología. Es posible que solo determinadas variedades de una enfermedad se asocien a un antígeno concreto (por ejemplo, formas con sacroileítis de la artritis psoriásica y B27).

- Si un determinado epitopo, compartido por más de una molécula, fuera el verdadero determinante de la enfermedad no existiría una relación absoluta con ninguno de los antígenos que lo compartieran.

- Puede que se requiera la asociación de dos antígenos, más específicamente, de una determinada asociación de subtipos concretos de dos antígenos determinados (especialmente moléculas DR ó DQ).

- La existencia de desequilibrio de desenlace entre los distintos elementos del haplotipo plantea la posibilidad de que el antígeno implicado no sea el relacionado con la enfermedad sino un gen próximo a él en ese haplotipo.

- También se ha planteado que la asociación estuviese condicionada por variaciones en los receptores de linfocitos T. Dada la restricción impuesta por las moléculas del CMH, estas serían marcadores indirectos.

- Los antígenos de clase I se comportan como presentadores de antígenos de factores ambientales (virus, bacterias): durante este proceso, los antígenos pueden sufrir cambios, o presentar similitudes estructurales con los antígenos propios, de tal manera que, que o bien no sean reconocido como extraños o, por el contrario, puedan inducir fenómenos de autoinmunidad que desencadenen el proceso patológico.

1.3.- ASOCIACION ENTRE HLA Y ENFERMEDAD DE BEHÇET

Ohno en 1972 (18) fué el primero en detectar una estrecha asociación entre HLA-B5 y enfermedad de Behçet, y posteriormente con su subtipo B51 (19). Esta asociación se confirma en la mayoría de países donde se estudia (Turquía (97), Italia (98), Grecia (99) Francia (100), Japón (101), Taiwan (102) y Méjico (103)) pero no en el Norte de Inglaterra (104), Estados Unidos (105) ni Alemania (106). Por lo general la asociación es más estrecha en los países donde B51 es más frecuente en la población general y donde la incidencia de la enfermedad es más alta (Tabla 1).

TABLA 1
PREVALENCIA DE EB Y FRECUENCIA DE B51 EN PACIENTES
Y CONTROLES EN DIVERSOS PAISES

País (referencia)	PRV	B51-CS	B51-EB
Hokkaido District, Japón (18,20)	10,00	30,50	75,00
Turquía (97, 107)	80,00	42,30	86,40
Olmsted County, Minnesota, U.S.A. (105)	4,00	10,00	12,00
Yorkshire, U K (97)	0,64	21,00	12,00
Galicia (108)	5,60	20,40	53,30
Islas Canarias (109)	2,00	12,00	43,70
Autores	9,00	16,00	34,30

PRV= Prevalencia por 100.000 habitantes. EB-CS= Frecuencia de B51 en controles sanos. B51-EB= Frecuencia de B51 en pacientes con enfermedad de Behçet.

Diversos autores ponen de manifiesto que la asociación con B51 es más estrecha en los pacientes con afección ocular (110, 111). Lehner (110) estableció correlación entre las distintas moléculas HLA de clase I y el tipo de manifestaciones relacionando a B51 con manifestaciones oculares, B12 con las mucocutaneas y B27 con las articulares. Estos dos últimos datos no han sido confirmados por otros autores. Actualmente está bien establecido que no hay ninguna relación entre B27 y E. de Behçet (8).

De nuevo Ohno en 1978 detecta que la asociación se establece con B51, que es un subtipo de B5 (112). A pesar de que el otro subtipo de B5, B52, solo se diferencia de B51 en 2 aminoácidos situados en la posición 63 y 67 (113), su asociación carece de significación en pacientes con enfermedad de Behçet. Por otra parte, los aminoácidos específicos, en esas dos posiciones de B51, de antígenos (B8, B14, B18, B35, B39, B65) sin que ninguno de ellos sea significativamente más frecuente en los pacientes con enfermedad de Behçet.

Mediante el estudio de moléculas de clase II no se ha encontrado ninguna tan claramente vinculada con la enfermedad como B51. Con respecto a moléculas DR los resultados son muy dispares (102, 114, 115), y con respecto a DQ, diversos autores detectan una mayor frecuencia de DQ3 (116)

(y alguno de sus alelos especialmente relacionada a la patología ocular de peor evolución (115)) y una menor frecuencia de DQ1 (101,116). También se han estudiado moléculas de clase III (101, 116), y, finalmente, se está investigando el la posible relación de la EB con los genes que codifican el TNF β (101) y, de nuevo, aunque se encuentran diferencias entre pacientes y controles, ninguna alcanza una diferencia tan significativa como B51.

Ohno interpreta que la peculiar distribución de la EB a lo largo de la Ruta de la Seda se debe a un origen étnico común (117). Según este autor debió existir un haplotipo ancestral que fué distribuido por esta zona por la población nómada que la recorrió durante siglos, y que el elemento patogénico debe estar localizado en el gen que codifica B51 o en una zona muy próxima a él en el haplotipo. De esta forma, las diferencias encontradas con moléculas de clase II, III y de TNF β se explicarían por el diferente desequilibrio de asociación de cada una de ellas con B51.

Sin embargo B51 no se correlaciona con E. de Behçet en países donde la incidencia de la enfermedad es baja como EEUU (105), e Inglaterra (97,104). En este último país no existe correlación con el total de pacientes, pero sí la hay con el grupo de pacientes con uveítis (110). Por otro lado los japoneses que emigran a EEUU no sufren la enferme-

dad (21). En el Norte de Japón la frecuencia de la enfermedad es más alta que en el Sur (20). Todos estos datos apuntan a que B51 no es elemento desencadenante por sí mismo y que requiere la cooperación de elementos ambientales, que parecen estar condicionados por factores geográficos, para que se desencadene la enfermedad.

Hay otro elemento que dificulta el análisis de la relación de B51 con EB y es la diversidad de criterios diagnósticos utilizados en las distintas series. En la mayoría de publicaciones japonesas solo se habla de formas completas si existe patología ocular y no se consideran elementos diagnósticos la sintomatología que acompaña a los síntomas cardinales (aftas orales, aftas genitales, afectación ocular y artritis). Por el contrario en países anglosajones no se considera obligatoria la presencia de patología ocular para establecer el diagnóstico y se da el mismo valor a las manifestaciones menos frecuentes de la enfermedad (patología neurológica o cutánea) que a los síntomas cardinales. El elemento que se considera imprescindible en todos los sistemas de criterios es la aftosis. De esta manera, no sabemos si la distinta frecuencia de B51 en los pacientes con EB es solo fruto de factores ambientales y genéticos o si, por el contrario está sesgada, al menos en parte, por la forma de establecer el diagnóstico. También se puede interpretar que la enfermedad tenga un espectro

distinto de manifestaciones, influido por factores ambientales y genéticos, y que la asociación con B51 esté solo en función de la afección ocular.

2. OBJETIVOS

2.- OBJETIVOS

La enfermedad de Behçet es una enfermedad de etiología desconocida en la que los estudios epidemiológicos hacen sospechar que existen factores geográficos, ambientales y genéticos que la condicionan. Por otro lado, el diagnóstico se apoya exclusivamente en datos clínicos ya que no existe ningún marcador clínico biológico ni histológico de la enfermedad y, hasta ahora, no hay unidad de criterios diagnósticos ya que la eficacia de los distintos sistemas varía de un país a otro.

Desde que se conoce la relación de la EB con B51 se está investigando su papel como marcador de la enfermedad y como elemento diagnóstico y pronóstico en estos pacientes. Por otro lado existen claras diferencias en la distribución geográfica de esta asociación. Así mismo se están estudiando otras moléculas del sistema HLA en la EB para intentar profundizar en la relación genético clínica de esta asociación.

Los objetivos de este trabajo son:

- 1.- Analizar la asociación de las moléculas HLA de clase I y II con la EB en nuestro entorno.
- 2.- Estudiar las posibles correlaciones entre las distintas moléculas HLA y la sintomatología clínica.

3.- Valorar el papel de las moléculas HLA como elementos diagnósticos y/o pronósticos en la EB.

3. MATERIAL Y METODO

3.- MATERIAL Y METODO

3.1.- PACIENTES

La muestra objeto de este estudio consta de 71 pacientes con EB. Para incluirlos en el estudio debían de cumplir suficientes criterios por cualquiera de los sistemas previamente descritos y que cuentan con reconocimiento internacional (O'Duffy (11), Mason & Barnes (10), "Behçet's Disease Research Committee of Japan"(12), o "International Study Group for Behçet's Disease en 1990 (9). Todos ellos fueron sometidos al mismo protocolo de estudio:

A) Historia clínica con especial atención a las manifestaciones sistémicas de la EB.

B) Estudio oftalmológico convencional o mediante angiografía fluoresceínica si procedía.

C) Analítica convencional.

D) Estudio inmunológico:

a) autoanticuerpos, factor reumatoide, complemento, test de tuberculina.

b) tipaje HLA para moléculas de clase I y II.

- c) serología frente a virus herpes, citomegalovirus y virus B de la hepatitis.

En pequeños subgrupos se realizaron investigaciones parciales, paralelas a esta tesis y algunas publicadas de forma independiente, pero que comentaremos por su interés: estudio de inhibidores circulantes de coagulación/anticuerpos anticardiolipina en 21; prevalencia de serología positiva frente a herpes-virus (26); investigación de la validez del fenómeno patérgico, macro/microscópicamente en 27 (7).

3.2.- TECNICAS DE LABORATORIO

En todos los paciente se investigaron las moléculas de clase I y II del CMH según las técnicas utilizadas en el Servicio de Inmunología de Nuestro Hospital:

A) TECNICA DE MICROLINFOTOXICIDAD

Los Ag HLA de clase I y II se determinaron serológicamente por la técnica de microlinfotoxicidad, aceptada por el NIH, introducida por Terasaki y McCelland en 1964 (85). La técnica consiste básicamente en enfrentar linfocitos, una vez que se han aislado de sangre periférica, a un panel de aloantisueros, cuyas especificidades se conocen, y complemento. El reconocimiento del antígeno de la superficie celular por los anticuerpos del suero da lugar a la formación de un

complejo antígeno-anticuerpo que, en presencia de complemento, conduce a la muerte celular. Las células muertas se distinguen mediante la utilización de colorante vital (eosina) que penetra en ellas y las tiñe de color rojo, mientras que las células vivas aparecen más pequeñas, brillantes y refringentes.

Inicialmente, se aíslan los linfocitos de sangre periférica de una muestra de sangre extraída por venipuntura (normalmente se extraen de 10 a 20 ml de sangre) y se recoge en un matraz erlenmeyer que contenga bolitas para desfibrinar y así reducir al máximo la contaminación de plaqueta (el proceso de desfibrinar consiste en agitar enérgicamente el erlenmeyer durante aproximadamente 10 minutos a temperatura ambiente). La sangre, una vez desfibrinada, se mezcla con tampón fosfato salino (PBS) (BioMérieux) en proporción 1:1. La mezcla se deposita cuidadosamente sobre ficoll-plenigraf (Pharmacia, Juste) ($d = 1.077$) y se centrifuga durante 20 minutos a 800 g y a 18° . Después de la centrifugación, se extrae la fase de células mononucleares (PBMC) y se lava tres veces mediante centrifugación durante 10 minutos a 700 g y resuspensiones sucesivas del botón celular en PBS. Las células, una vez lavadas, se cuentan en una cámara de Neubauer y se resuspenden a una concentración de 5×10^6 células/ml. Posteriormente se dispensa $1 \mu\text{l}$ de esta suspensión en cada uno de los pocillos de la placa de Terasaki, que

contienen aloanticuerpos para moléculas HLA conocidas, y se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente añadiendo, a continuación, 6 μ l por pocillo de complemento no citotóxico de conejo (Behring). Al cabo de 1 hora adicional de incubación a temperatura ambiente, se procede a la tinción de las células añadiendo 3 μ l por pocillo de una solución de eosina al 5% (Merck) pH 7.2 y, después de 3 minutos, se fija con formol (Quimiión pH 7.2).

El estudio serológico de las especificidades HLA de clase II se efectuó sobre suspensiones celulares enriquecidas en linfocitos B. Para ello, los linfocitos obtenidos de 20 ml de sangre desfibrinada se resuspendieron en 0,8 ml de medio de cultivo RPMI 1640 enriquecido con 10% de suero fetal bovino. La suspensión se depositó en una columna que contenía 100 mg de fibra de nylon (Leukopak, Fenwall), con un orificio de 2 mm. y que había sido previamente saturada del mismo medio de cultivo e incubada durante 30 minutos a 37° C.

Una vez añadida la suspensión celular, la columna se incuba a 37° durante 45 minutos, al término de los cuales se dejan caer, gota a gota, 10 ml de medio de cultivo a través de ella, de manera que las células no adherentes (linfocitos T) sean eluidas a un tubo de centrífuga. La columna se lava con 20 ml de medio de cultivo y, a continuación, se añaden otros 10 ml de medio, arrastrándose las células adherentes

(linfocitos B) por escurridos enérgicos de la columna. El método proporciona una pureza de linfocitos B del 90 al 95%.

Las células B son enfrentadas, por medio de la técnica clásica de microlinfotoxicidad del NIH, a un panel de aloantisueros que reconocen antígenos HLA-DR y DQ cuyas especificidades se han determinado previamente y en las que se ha eliminado la posible actividad anti clase I por incubación a diversas temperaturas con un concentrado de plaquetas procedente de 100-200 donantes distintos. Se procede de idéntico modo al descrito en el caso de especificidades de clase I, salvo que la incubación de las células con el anticuerpo se prolonga hasta 45 minutos y el tiempo de incubación con el complemento es de 90 minutos.

La evaluación de resultados se lleva a cabo en un microscopio invertido de contraste de fases; las células vivas aparecen refringentes mientras que las células muertas no excluyen el colorante y presentan una coloración roja oscura. La valoración de la citotoxicidad se realiza mediante la estimación visual del porcentaje de mortalidad celular de acuerdo a la siguiente escala:

<u>% de mortalidad celular</u>	<u>puntuación</u>
80-100%	8
60-80	6
40-60	4
20-40	2
0-20	-

B) OLIGOTIPAJE MEDIANTE PCR-SSO

Básicamente, consiste en la determinación, mediante el uso de sondas oligonucleotídicas con especificidad HLA de clase II (90, 118). Permite definir sobre el DNA, diversos variantes relativas a una misma molécula, DR o DQ, determinada previamente por métodos serológicos. De los diferentes genes que codifican las dos cadenas de ambas moléculas solo hemos investigado el DRB1 genérico y los distintos alelos de DQB1.

Consta, fundamentalmente, de dos pasos:

a) amplificación mediante PCR de segmentos de DNA, preseleccionados mediante cebadores específicos, que corresponden a los genes HLA que se van a estudiar.

b) enfrentamiento del material obtenido con un panel que contiene sondas de oligonucleótidos complementarios específicos para diferentes alelos conocidos de los genes estudiados.

a) Extracción de ADN

Existe un gran número de protocolos para la extracción de ADN; la mayoría de ellos encaminados a la obtención de ADN altamente purificado. En este trabajo, se ha utilizado un método rápido de extracción de ácidos nucleicos, poco purificados, pero que pueden ser utilizados con muy buenos resultados para su amplificación por PCR.

1.- A partir de líneas celulares: Se centrifugan 5×10^5 células en crecimiento exponencial a 700 g durante 10 minutos y se resuspende el botón celular en 100 μ l de tampón K (KCl 50 mM, Sigma, Tris-ClH 10-20 mM, MgCl₂ 2.5 mM, Merck, 0.5% de Tween-20, Sigma, y 100 μ g/ml de proteinasa K fresca, Sigma). Se incuba durante 45 minutos a 56°C para digerir las células y, posteriormente, durante 10 minutos a 95°C para inactivar las proteasas. En las reacciones de PCR se emplean 10 μ l del lisado celular.

2.- A partir de sangre periférica: La muestra de sangre se extrae por venipuntura y se recoge directamente en

tubos estériles con anticoagulante (EDTA-K₃). En un tubo eppendorf de 1.5 ml, se añaden 0.5 ml de TE (Tris-Cl 10 mM pH 7.6, EDTA 1 mM, Sigma, pH 8.0) a 50 µl de sangre y se centrifuga durante 10 segundos a 13.000 x g. A continuación, el botón celular se resuspende en 0.5 ml de TE y, de nuevo, se centrifuga durante 10 segundos a 13.000 x g repitiendo este procedimiento 2 veces más para, finalmente, resuspender el botón en 100 µl de tampón K y, posteriormente proceder como en el apartado anterior.

b) Amplificación de ADN por PCR

1.- Cebadores usados en la amplificación: la amplificación de ADN se realiza por PCR empleando un grupo de cebadores específicos para el segundo exón de los genes DRB1 y DQB1. (Tabla 2).

TABLA 2

CEBADORES USADOS PARA LA AMPLIFICACION DEL SEGUNDO EXON DE LOS GENES DRB1 Y DQB1.

NOMBRE	SECUENCIA (5'-----> 3')	ESPECIFICIDAD	REFERENCIA
DRBP1	CCG GAT CCT TCG TGT CCC CAC AGC ACG	DR1 Genérico	Tiercy et al. (1990) (138)
DRBP2	TCG CCG CTG CAC TGT GAA G		
90-125	CCG GTC GAC TCC CCG CAG AGG ATT TCG TG	DQB1	Mehra et al. (1991) (120)
90-126	TGC TCT AGA GGG CGA CGC TCA CCT C		

2.- Mezcla de reacción: la mezcla de reacción para la PCR se compone de 10 μ l de lisado celular, 10 μ l de tampón de PCR (KCl 50 mM, MgCl₂ 1.5 mM, Tris-Cl 10 mM pH 8.3, 1mg/ml de gelatina, Sigma), 0.2 mM de cada deoxi-nucleótido trifosfato (dNTP: dATP, dTTP, dGTP, dCTP, Boehringer Mannheim), 2 U de Taq DNA-polimerasa (Boehringer Mannheim), y H₂O bidestilada hasta un volumen final de 100 μ l. La mezcla de reacción se cubre con 70 μ l de aceite mineral (Sigma), para evitar la evaporación, y se calienta durante 5 min a 95°C

3.- Parámetros de los ciclos de PCR: La amplificación se realiza en un termociclador programable Perkin-Elmer, y consta de 30 ciclos. Cada ciclo consiste en una etapa de desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, otra de reanillamiento a 55°C durante 1 min seguida de una etapa de extensión a 72°C durante 1 min. Al final de la amplificación se realiza una etapa de extensión a 72°C durante 7 minutos. Se incluyeron controles negativos (TE) en cada ensayo (Kwok et al. 1989).

4.- Visualización del producto de amplificación: el tamaño y la cantidad de los productos amplificados se visualiza mediante electroforesis submarina en un gel de agarosa (Bio-Rad) al 1.5% (peso/volumen) en tampón TBE 0.5 X (Tris base 89 mM, Sigma, ácido bórico 89 mM,

Sigma, EDTA 2 mM, pH 8.0). La agarosa se disuelve calentado hasta ebullición. La mezcla se deja enfriar hasta unos 60°C añadiendo entonces 0.5 $\mu\text{g/ml}$ de bromuro de etidio (Bio-Rad). A continuación, se vierte el gel en una cubeta dejando que se solidifique. El aceite mineral se elimina de la mezcla de reacción mediante extracción con 200 μl de cloroformo (Quimon). Se cargan 5 μl de producto de amplificación, mezclados con 1.25 μl de solución azul ("Blue Juice" 5 X) (azul de bromofenol, Sigma, al 0.2%, xilenocianol, Sigma, al 0.2%, y glicerol, Merck, al 25%) en cada uno de los pocillos del gel. Como marcadores de peso molecular se utiliza ADN del fago OX174 digerido con la enzima de restricción Hae III (BRL). Los geles se someten a electroforesis en tampón TBE 0.5 X durante 15-30 minutos a 15 V/cm. Una vez concluida, se examina el gel bajo luz ultravioleta en un transiluminador del que se obtiene un registro fotográfico mediante una fotografía instantánea con un sistema Polaroid.

5.- Unión del ADN amplificado a membranas de nylon: se desnaturalizan 30 ng, aproximadamente, del producto de PCR en 50 μl de una solución NaOH 0.4 N (Sigma) y EDTA 25 mM, durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, las muestras se sitúan sobre un baño de

hielo para aplicarlas, rápidamente, a membranas de nylon cargadas positivamente (Boehringer Mannheim), empleando para ello un sistema de dot-blot de 96 pocillos y siguiendo las instrucciones del fabricante (Biodot, Bio-Rad). El ADN inmovilizado se fija entonces a la membrana mediante irradiación con luz ultravioleta en un Stratalinker 1800 (Stratagene). Las membranas se pueden almacenar entre hojas de papel Whatman 3 MM hasta el momento de su utilización.

6.- Sondas oligonucleotídicas: se emplearon 14 sondas oligonucleotídicas, para la tipificación genérica HLA-DR, que permiten identificar 12 especificidades HLA-DR (119) y 14 sondas para la identificación de 12 alelos DQB1 (120) (tablas 3 y 4).

7.- Marcaje de las sondas: las sondas oligonucleotídicas fueron marcadas en su extremo 3' con DIG-11-ddUTP (Boehringer Mannheim). La reacción de marcaje se realizó en un tubo eppendorf de 0.5 ml en un baño de hielo, mezclando 4 μ l de tampón de transferasa terminal 5 X (cacodilato potásico 1M, Tris-HCl 125 mM, 1.25 mg/ml de albúmina sérica bovina, pH 6.6, Boehringer Mannheim), 4

TABLA 3
 SONDAS OLIGONUCLEOTIDICAS UTILIZADAS EN
 LA ASIGNACION DE ALELOS DE DRB1

NOMBRE	SECUENCIA (5'-----3')	ESPECIFICIDAD
L11	TTC AAA CTT AAG CTG CCA C	DR1 (0101, 0102, 0103)
D11	CTC ATA CTT ATC CTG CTG C	DR2 (DRB5, todos los subtipos)
N77	TCT GCA GTA GTT GTC CAC C	DR3 (0301, 0302)
H33	CTC TTG GTG ATA GAA GTA TC	DR4 (0401-0409)
E58	CCA GTA CTC CTC ATC AGG C	DR11 (1101-1104)
L37	AGC GCA GGA GCT CCT CCT G	DR12 (1201,1202)
E71	GGC CCG CTC GTC TTC CAG G	DR13 (1301,1302,1304) DR-Br (0103) DR4 (0402) DR11 (1102, 1103)
K71	CGG CCC GCT TGT CTT CCA G	DR13 (1303)
H60	GTT CCA GTG CTC CGC AGC A	DR14 (1401)
G11	CTT ATA CTT ACC CTG CCA C	DR7
L74	GTG TCC ACC AGG GCC CGC C	DR8 (0801-0804)
Y26	CTG TGC AGA TAC CGC ACC C	DR9
V11	CTC AAA CTT AAC CTC CTC C	DR10
N37	AGC GCA CGT TCT CCT CCT G	DR3 (0301,0302) DR13 (1301,1302,1305) DR14 (1402)

TABLA 4

SONDAS OLIGONUCLEOTIDICAS UTILIZADAS EN LA ASIGNACION DE ALELOS DQB1

NOMBRE	SECUENCIA (5'-----3')	ESPECIFICIDAD
90-127	ACA CAA CTA CGA CGT CGC GT	0501,0502,0503,0601,0602,0603
90-128	CGT GGG GCT GCC TGC CGC CG	0201
90-130	TGC GGC GGC TTG ACG CCG AG	0401,0402
90-131	GGC GGC CTG TIG CCG AGT AC	0501,0604
90-132	GGC GGC CTA GCG CCG AGT AC	0502
90-133	AGG GGC GGC CTG ACG CCG AG	0503,0601
90-134	AGG GGC GGC CTG ATG CCG AG	0602,0603
90-135	GCT GGG GCC GCC TGC CGC GC	0302
90-136	TGG GGC CGC CTC ACG CCG AG	0301,0303
90-137	CGC GTG CGT TAT GTG ACC AG	0601,0301
90-139	GAG CGT GTG CGG GGT GTG AC	0501,0502,0503,0402
90-139	GAG CGC GTC CGG GGT GTG AC	0501,0502,0503,0402
90-293	GGG ACC GAG CTC GTG CGG GG	0401
90-290	TGC GTC TIG TGA CCA GAT AC	0302,0303,0602
90-291	TGC GTC TTG TAA CCA GAC AC	0603,0604

μl de una solución de CoCl_2 25 mM (Boehringer Mannheim), 100 pmoles del oligonucleótido correspondiente, 1 μl de DIG-11-ddUTP 1M, 2 μl (50 unidades) de transferasa terminal (Boehringer Mannheim), completando con ddH₂O hasta un volumen final de 20 μl . La mezcla se incuba a 37°C durante 15 minutos para, posteriormente, transferir los tubos a un baño de hielo en el que la reacción se detiene añadiendo 2 μl de una solución obtenida mezclando 1 μl de solución de glicógeno a una concentración de 20mg/ml (Boehringer Mannheim), con 200 μl de una solución de EDTA, 0.2 M pH 8.0. Una vez marcado, el oligonucleótido se precipita con 2.5 μl de LiCl (Sigma) 4 M y 75 μl de etanol absoluto (Panreac) preenfriado a -20°C, mezclando bien e incubando al menos 30 minutos a -70°C ó 2 horas a -20°C. Posteriormente, la mezcla se centrifuga a 12.000 x g durante 20 minutos a 4°C, tras lo cual se elimina el sobrenadante mientras que el sedimento se lava con 50 μl de etanol al 70%, para volver a centrifugar a 12.000 x g, esta vez durante 10 minutos a 4°C, desechando de nuevo el sobrenadante. El precipitado final se seca bajo vacío y se resuspende en 100 μl de ddH₂O. El oligonucleótido marcado se puede almacenar a -20°C hasta el momento de su utilización.

8.- Hibridación: los filtros de nylon se someten a una etapa de prehibridación, mediante inmersión en una solu-

ción de prehibridación (0.2 ml/cm²) conteniendo SSPE 6 X (preparado a partir de una solución stock 30 X, cuya composición es NaCl 4.5 M, Sigma, NaH₂PO₄ 0.3 M, Gibco, EDTA 30 mM; pH 7.4), solución Denhardt's 5 X (preparada a partir de una solución stock 50 X, que contiene Ficoll al 1% (tipo 400, Pharmacia); 1% de polivinilpirrolidona (Sigma) y 1% de albúmina sérica bovina (fracción V, Sigma)), 0.1% de N-lauril-sarcosina sódica (Sigma), 0.02% de dodecilsulfatosódico (SDS) (Bio-Rad), 0.5% de solución de bloqueo (Boehringer Mannheim). Las membranas se incuban a 42°C durante al menos 30 min, en un horno de hibridación (Hybaid). Tras la etapa de prehibridación, se añade a cada tubo la correspondiente sonda oligonucleotídica marcada (2 pmoles/ml de solución), incubando a 42°C durante al menos 2 horas. La solución de hibridación a la que se ha añadido la sonda marcada se puede almacenar a -20°C y reutilizar dos veces.

9.- Lavados de astringencia: una vez finalizada la etapa de hibridación, los filtros se lavan para eliminar totalmente la sonda unida de forma inespecífica. Para ello, se sumergen en primer lugar en una solución SSPE 2 X, con SDS al 0.1% a temperatura ambiente, con agitación, en bateas de plástico adecuadas al tamaño de los filtros, utilizando un volumen de 50-100 ml por cada 100 cm² de membrana. Posteriormente, se lavan en solución

TMAC (cloruro de tetrametil-amonio 3 M, Merck, Tris-HCl 50 mM pH 8.0, SDS 0.1%, EDTA 2 mM pH 8.0) durante 10 minutos a temperatura ambiente, con agitación. A continuación, se lavan los filtros 2 veces con solución TMAC a la temperatura adecuada (para oligonucleótidos con 18 bases 58°C, 19 bases-59°C, 20 bases-60°C, 21 bases-61°C, 22 bases-62°C) y con agitación para, por último, lavar 2 veces con solución SSPE 2 x, SDS 0.1% a temperatura ambiente, con agitación, durante 5 min. Los lavados con TMAC permiten que la temperatura de los mismos sea independiente del contenido en bases GC de la sonda y sólo dependa de su longitud (121).

10.- Detección inmunológica de los híbridos mediante sondas específicas marcadas: tras los lavados de astringencia, se equilibran los filtros con tampón 1 (ácido maleico 0.1 M, Sigma, NaCl 0.15 M; pH 7.5) conteniendo un 0.3% de Tween-20, durante 5 min con agitación. Todas las etapas de la detección inmunológica se efectúan con agitación y a temperatura ambiente. Posteriormente, los filtros se incuban en tampón 2 (1% de reactivo de bloqueo (p/v) en tampón 1) durante 30 min, para evitar la unión inespecífica del anticuerpo. Después de este tratamiento, se añade 75 mU/ml de fragmentos F(ab')₂ de oveja anti-digoxigenina conjugados con fosfatasa alcalina (Boehringer Mannheim), incubando durante 30

minutos. El anticuerpo no unido de forma específica se elimina lavando las membranas dos veces con tampón 1-0.3 % Tween-20, durante 15 minutos. A continuación, las membranas se equilibran con tampón 3 (Tris-HCl 0.1 M, NaCl 0.1 M, MgCl₂ 50 mM, pH 9.5) durante 5 minutos para, por último, añadir 10 ml de tampón 3 conteniendo 100 µl de una solución stock de AMPPD de 10 mg/ml (Boehringer Mannheim). El AMPPD (4-metoxi-4-(3-fosfatofenil) spiro (1,2-dioxetano-3,2'-adamanta o (C₁₈H₂₁O₇PNa₂)) es un sustrato quimioluminiscente de la fosfatasa alcalina. La luz emitida en la reacción (477 nm) impresiona placas de rayos X. La placa de rayos X (X-O-mat AR, Kodak, Rochester, NY) se expone a los filtros húmedos desde 1 min a varias horas hasta obtener la señal adecuada.

11.- Rehibridación de los filtros: dado el gran número de sondas oligonucleotídicas usadas, es conveniente despegar las sondas de los filtros una vez concluida la etapa de detección para poder rehibridarlos con otras sondas diferentes. Existen diferentes protocolos para deshibridar los filtros. El método empleado en este trabajo consistió en incubar los filtros con 100 ml de una solución NaOH 0.4 M por cada 100 cm² de membrana, durante 30 minutos a 42°C con agitación. Posteriormente, los filtros se incuban en una solución Tris-HCl 0.2M, pH 7.5, SSPE 0.1 X, SDS 0.5%, durante 30 min a 42°C con

agitación. Tras este tratamiento, las membranas se encuentran en condiciones de ser sometidas a una nueva etapa de hibridación.

3.3. - ANALISIS ESTADISTICO

Los datos se almacenaron utilizando el programa dBASE III Plus, versión 1.0, de Asthon-Tate. Para la valoración estadística se utilizó un programa comercial (Kwikstat, versión 3, de Texasoft) y un programa de diseño propio (Riesgo) para las distintas estimaciones:

A) COMPARACION DE PORCENTAJES

Prueba de χ^2 al cuadrado modificada, en caso necesario, mediante la corrección de Yates o la prueba exacta de Fischer para pequeñas muestras en caso de subestratificaciones con reducción importante del número de la muestra.

B) COMPARACION DE MEDIAS

Las variables continuas se analizaron mediante la prueba de la t de Student, de dos colas, para análisis de series de valores independientes.

C) ESTIMACION DEL RIESGO RELATIVO

Indica cuantas veces más a menudo ocurre una enfermedad en individuos que poseen un cierto antígeno, en comparación

con aquellos que carecen de él. Se ha calculado mediante la fórmula de Woolf (con valoración concomitante del nivel de significación en la diferencia de porcentajes mediante las pruebas anteriores). Se utilizó la modificación de Haldane (122) en aquellos casos en que un antígeno está presente o ausente en todos los pacientes o controles. (Tabla 5)

TABLA 5

ESQUEMA DE APLICACION DEL CALCULO DE RIESGO RELATIVO

Grupo	Con antígeno	Sin antígeno	Total
Pacientes	a	b	a+b
Controles	c	d	c+d
Total	a+c	b+d	a+b+c+d
Riesgo Relativo	Wolff		Haldane
	$\frac{ad}{bc}$		$\frac{(a+0.5)(d+0.5)}{(b+0.5)(c+0.5)}$

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1.- DATOS EPIDEMIOLOGICOS

La serie objeto de estudio comprende 71 pacientes diagnosticados de EB. Sus principales características epidemiológicas se expresan en la tabla 6. Cincuenta y seis de ellos proceden de una población estimada de 600.000 habitantes (cubierta asistencialmente por el Hospital de referencia) por lo que la prevalencia mínima estimada es de 9 pacientes por 100.000 habitantes (Figura 10).

Se utilizaron, como criterios diagnósticos, los elaborados por O'Duffy en 1976 (11); además, se aplicaron distintos sistemas de criterios, a toda la serie, por medio de un subprograma informático de elaboración propia escrito en DBase (tabla 7).

TABLA 6
DATOS EPIDEMIOLOGICOS

DATOS EPIDEMIO- LOGICOS	TOTAL		HOMBRE		MUJER		p
	71		39	55 %	32	45 %	
	M	DS	M	DS	M	DS	
EDAD DE CO- MIENZO	28,2	11,9	26,8	11,6	29,9	12,5	0,277
RETRASO DIAGNOSTICO	7,11	9,6	5,9	7,1	9,7	11,5	0,050
PREVALENCIA 9/100.000							

Enfermedad de Behçet. (N=71).

**Distribución
de 56 pacientes**

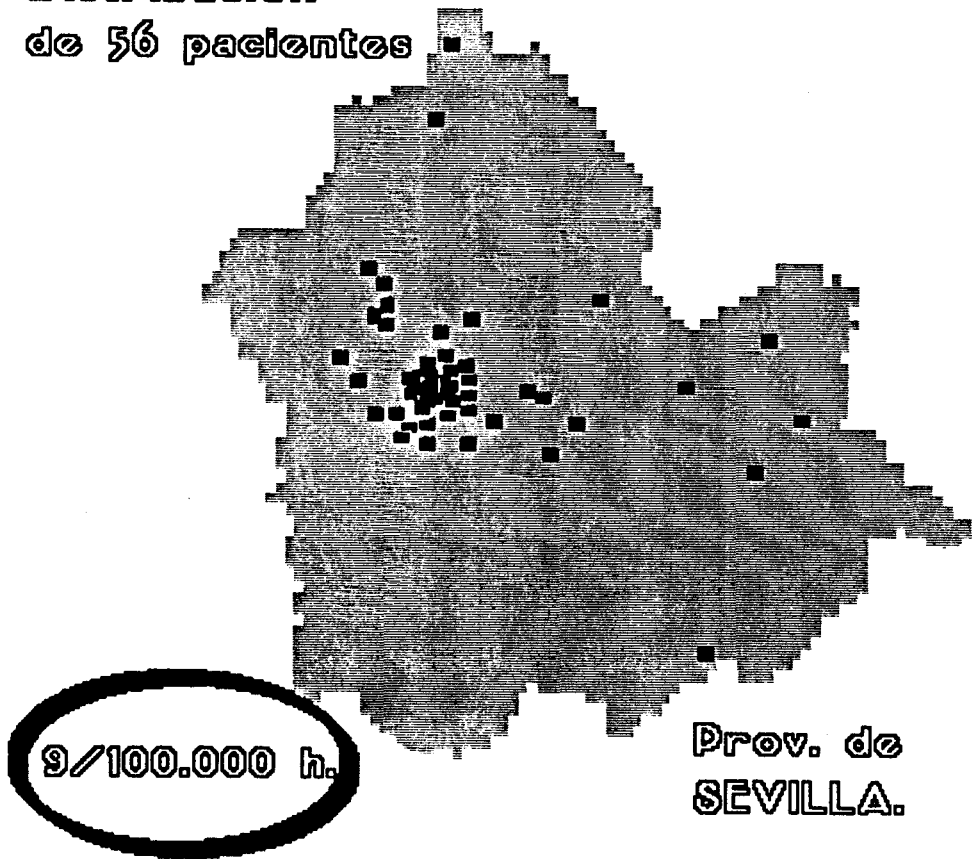


Figura 10.- Prevalencia estimada de la enfermedad de Behçet en la provincia de Sevilla.

4.2.- DATOS CLINICOS

En la tabla 8 se registran las principales categorías de síntomas, relacionadas con la EB, en la tabla 9 la frecuencia relativa de cada una de las mismas en la serie objeto de estudio, y en la tabla 10 los síntomas más frecuentes al inicio de la enfermedad.

TABLA 7
CRITERIOS DIAGNOSTICOS UTILIZADOS

CRITERIOS	TIPO	PACIENTES:71	%
O'DUFFY Y GOLSTEIN 1976	COMPLETO	69	97
	INCOMPLETO	2	3
MASON Y BARNES 1969	DIAGNOSTICO	63	89
	NO DIAGNOSTICO	8	11
COMITE JAPONES 1979	COMPLETO	22	31
	INCOMPLETO	37	52
	NO DIAGNOSTICO	12	17
COMITE INTERNACIONAL 1990	DIAGNOSTICO	55	78
	NO DIAGNOSTICO	16	22

TABLA 8

DATOS CLINICOS DE TODOS LOS PACIENTES CON EB

<u>N</u>	<u>S</u>	<u>E C</u>	<u>U O</u>	<u>U G</u>	<u>A C</u>	<u>A O</u>	<u>S N</u>	<u>A R</u>	<u>T R</u>	<u>E P</u>	<u>A D</u>
1	M	38	1	1	1	1	1	0	0	0	0
2	M	31	1	1	0	0	0	1	1	0	0
3	V	28	1	0	1	1	0	0	0	0	0
4	M	66	1	1	1	1	0	0	1	0	0
5	V	26	1	1	1	0	0	1	0	1	1
6	M	33	1	1	1	1	0	1	0	0	0
7	V	34	1	1	1	1	0	0	0	0	0
8	M	24	1	1	1	1	0	0	0	0	0
9	V	15	1	1	1	1	0	0	0	0	0
10	V	30	1	1	1	1	0	1	0	0	0
11	V	59	1	1	1	0	0	1	0	1	1
12	V	26	1	1	0	0	1	1	1	0	0
13	V	20	1	1	1	0	0	1	0	0	0
14	V	14	1	1	1	0	0	1	0	0	0
15	V	17	1	1	1	1	0	1	0	1	0
16	V	11	1	1	1	1	0	1	0	0	0
17	M	25	1	0	1	1	0	1	0	0	0
18	V	25	1	0	0	1	1	1	0	0	0
19	M	13	1	1	0	1	0	1	0	0	0
20	M	45	1	1	0	1	0	0	0	0	1
21	V	31	1	0	1	1	0	0	0	0	0
22	M	30	1	1	1	1	0	1	0	0	0
23	M	23	1	1	1	0	0	0	0	0	0
24	V	15	1	1	0	1	0	0	0	0	1
25	V	35	1	0	0	0	1	0	1	0	1

N = Número de registro

S = Sexo

EC = Edad comienzo enfermedad

UO = Ulcera oral

UG = Ulcera genital

AC = Afección cutánea

AO = Afección ocular

SN = Afección neurológica

AR = Artritis

TR = Tromboflebitis

EP = Epididimitis

AD = Afección digestiva

TABLA 8 (CONTINUACION)

DATOS CLINICOS DE TODOS LOS PACIENTES CON EB

<u>N</u>	<u>S</u>	<u>EC</u>	<u>UO</u>	<u>UG</u>	<u>AC</u>	<u>AO</u>	<u>SN</u>	<u>AR</u>	<u>TR</u>	<u>EP</u>	<u>AD</u>
26	V	34	1	1	1	1	0	0	0	0	0
27	V	23	1	1	0	1	0	0	0	0	0
28	V	15	1	0	1	1	0	1	0	0	0
29	M	12	1	1	0	1	0	0	0	0	0
30	M	10	1	1	0	0	0	1	0	0	0
31	M	35	1	1	1	0	0	1	0	0	0
32	V	23	1	1	0	1	0	0	0	0	0
33	V	38	1	1	1	0	1	1	0	1	0
34	V	25	1	1	0	0	0	1	0	0	1
35	M	29	1	1	0	1	0	1	0	0	0
36	V	47	1	1	0	0	0	1	0	1	0
37	V	21	1	1	1	1	1	0	0	1	0
38	M	15	1	0	1	1	0	0	0	0	1
39	V	23	1	1	1	1	0	1	0	0	0
40	V	18	1	1	1	0	0	1	1	0	0
41	V	15	1	1	1	1	0	1	0	0	0
42	V	40	1	1	0	1	0	1	1	0	1
43	V	10	1	1	1	1	0	1	0	0	0
44	V	25	1	1	1	1	1	1	0	1	0
45	M	22	1	1	0	0	0	1	1	0	0
46	V	14	1	0	0	1	0	1	0	0	0
47	M	30	1	1	1	1	1	1	0	0	0
48	M	34	1	1	1	0	0	0	0	0	0
49	M	20	1	0	1	1	1	1	0	0	0
50	V	28	1	0	0	0	1	1	1	0	0

N = Número de registro

S = Sexo

EC = Edad comienzo enfermedad

UO = Ulcera oral

UG = Ulcera genital

AC = Afección cutánea

AO = Afección ocular

SN = Afección neurológica

AR = Artritis

TR = Tromboflebitis

EP = Epididimitis

AD = Afección digestiva

TABLA 8 (CONTINUACION)

DATOS CLINICOS DE TODOS LOS PACIENTES CON EB

<u>N</u>	<u>S</u>	<u>E C</u>	<u>U O</u>	<u>U G</u>	<u>A C</u>	<u>A O</u>	<u>S N</u>	<u>A R</u>	<u>T R</u>	<u>E P</u>	<u>A D</u>
51	M	33	1	1	0	0	1	1	0	0	0
52	M	36	1	1	1	0	0	0	0	0	0
53	M	49	1	0	0	1	0	0	0	0	0
54	M	47	1	1	0	0	1	1	0	0	0
55	M	18	1	0	1	1	0	0	0	0	0
56	V	57	1	1	1	0	0	1	1	1	0
57	M	44	1	1	1	1	0	0	0	0	0
58	M	25	1	1	1	1	0	0	0	0	1
59	V	29	1	0	1	1	0	1	0	1	0
60	M	27	1	1	1	1	0	0	0	0	0
61	V	30	1	1	0	1	0	0	0	0	0
62	V	28	1	0	0	1	1	0	0	1	0
63	V	47	1	1	0	0	0	1	0	0	0
64	M	25	1	1	0	1	0	1	1	0	1
65	M	15	1	1	1	0	0	1	1	0	0
66	V	18	1	1	1	0	0	0	0	0	0
67	M	33	1	1	1	0	0	0	0	0	0
68	M	31	1	1	1	1	1	0	0	0	0
69	V	20	1	1	1	1	0	1	0	0	0
70	M	40	1	1	0	0	1	0	0	0	0
71	V	32	1	1	1	0	0	1	0	0	0

N = Número de registro

S = Sexo

EC = Edad comienzo enfermedad

UO = Ulcera oral

UG = Ulcera genital

AC = Afección cutánea

AO = Afección ocular

SN = Afección neurológica

AR = Artritis

TR = Tromboflebitis

EP = Epididimitis

AD = Afección digestiva

TABLA 9

DATOS CLINICOS II

MANIFESTACIONES CLINICAS	Nº	%
ULCERAS ORALES	71	100
ULCERAS GENITALES	57	80,28
AFECCION CUTANEA	45	63,38
AFECCION OCULAR	44	61,97
AFECCION ARTICULAR	42	59,15
AFECCION S.N.C	14	19,71
TROMBOFLEBITIS	11	15,49
EPIDIDIMITIS	10	14,08
AFECCION DIGESTIVA	9	12,67
HISTORIA FAMILIAR	3	4,22
AFECCION CARDIACA	2	2,81
AFECCION PULMONAR	1	1,40
AFECCION RENAL	1	1,40

TABLA 10

SINTOMAS AL INICIO DE LA ENFERMEDAD

SINTOMA INICIAL	Nº	%
AFTAS ORALES	49	71,01
AFTAS GENITALES	29	42,02
AF. OCULAR	20	28,98
AF. ARTICULAR	7	10,14
AF. CUTANEA	5	7,24
TROMBOFLEBITIS	5	7,24
EPIDIDIMITIS	3	4,34
AF. SNC	3	4,34
AF. DIGESTIVA	1	1,44

A) SINTOMATOLOGIA OCULAR

Presentaron sintomatología ocular 43 pacientes (63,2 %). En 32 de ellos (74,4 %) de forma bilateral. La distribución de la afección ocular entre ambos sexos (tabla 11) fue similar (53 % en varones y 46 % en mujeres) pero, en los primeros, predominaba la aparición precoz, tanto en el conjunto de la enfermedad como en las manifestaciones oculares. Las lesiones observadas se recogen en la tabla 12. En 20 pacientes la afección ocular estaba presente desde el inicio de la enfermedad y el promedio de tiempo de aparición de la sintomatología ocular, en los que no la presentaban desde el inicio, fue de 2 años. En la figura 11 se representa la curva actuarial de afectación ocular en nuestra serie. En la mayoría de los pacientes que la sufrieron se registró su inicio en los 5 primeros años de evolución de la enfermedad.

Estos pacientes fueron controlados conjuntamente por nuestra Unidad y por el Servicio de Oftalmología. El tratamiento de primera línea consistía en medidas locales y corticosteroides sistémicos. En 24 pacientes (50 %) el proceso inflamatorio no respondió a dicho tratamiento, situación que definimos como uveítis refractaria. Estos últimos fueron incluidos en un protocolo de tratamiento con ciclosporina-A (CyA). Los que fueron resistentes a este segundo esquema terapéutico (7 pacientes) se sometieron a tratamiento con-

junto con CYA e interferon alfa recombinante. Seis pacientes han evolucionado hasta la amaurosis, 5 afectando un solo ojo y en otro de forma bilateral, es decir 9,33 % de un total de 75 ojos afectados. El paciente con amaurosis bilateral fue remitido a nuestra consulta cuando ya llevaba años en esa situación.

TABLA 11

PATOLOGIA OCULAR I

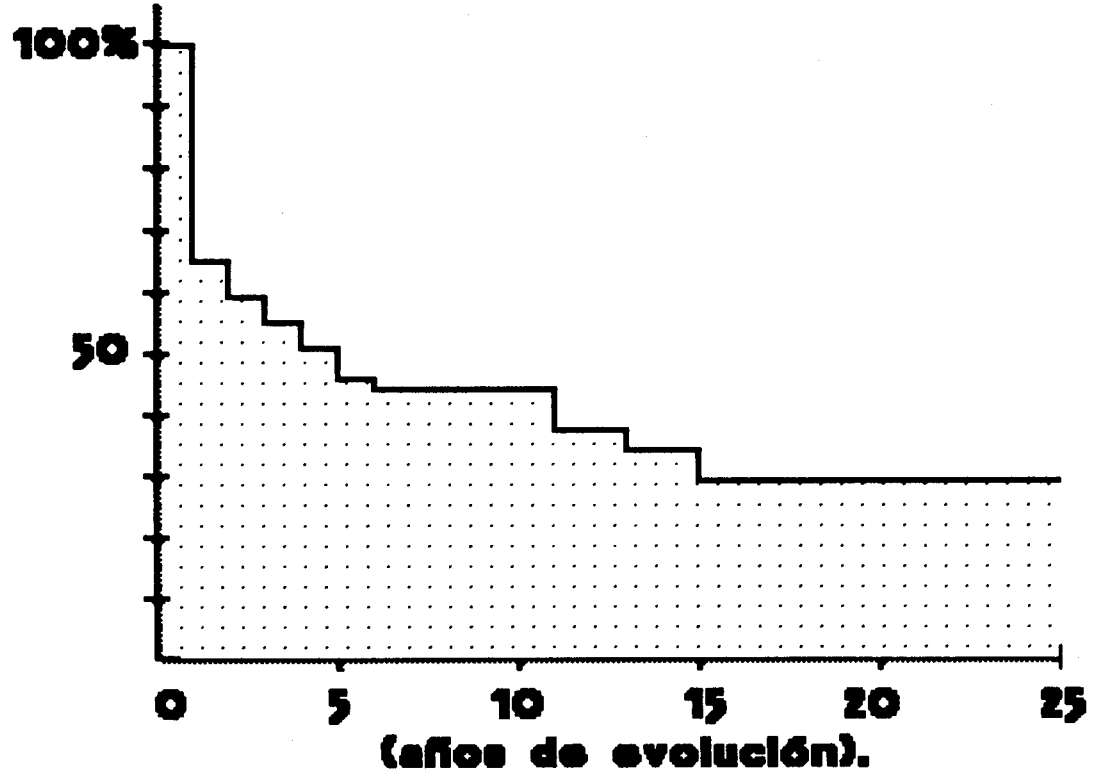
PACIENTES CON LESIONES OCULARES	HOMBRE: 24		MUJER: 20		p
	M	DS	M	DS	
EDAD COMIENZO	23,3	8	29,9	13	0,06
TIEMPO APARICION(*)	1,7	3	2,8	6,6	0,5
EDAD AF.OCULAR	25	7,8	32,8	13,7	0,034
FRECUENCIA	54 %		46 %		0,9

(*) A partir del primer síntoma.

TABLA 12
 PATOLOGIA OCULAR II

LESIONES OCULARES: 42 pacientes (71 ojos afectados)	<u>T</u>	%	UL	BL
AMAUROSIS	6	8,45	5	1
TYNDAL	10	14,08	3	6
EDEMA DE RETINA	12	16,90	5	7
EDEMA DE PAPILA	12	16,90	7	5
EXUDADOS DE RETINA	4	5,63	1	3
HEMORRAGIA DE RETINA	5	7,04	2	3
COROIDITIS	13	18,30	7	5
VASCULITIS DE RETINA	12	16,90	5	7
FIBROSIS RETINO VITREA	3	4,22	2	1
HEMORRAGIA VITREA	2	2,81	0	2
VITREO TURBIO	15	21,12	6	9
IRITIS	17	23,94	8	9
CONJUNTIVITIS	7	9,85	4	3
QUISTE DE MACULA	1	1,40	0	1
ULCERA CORNEAL	2	2,81	0	2
HIPOPION	3	4,22	0	3
PRECIPITADOS QUERATICOS	6	8,45	0	6
CATARATAS	6	8,45	1	5
EDEMA DE MACULA	13	18,30	2	11
OPACIDAD VITREA	8	11,26	2	5
ATROFIA OPTICA	5	7,04	2	3

Enfermedad de Behçet



Inicio de participación ocular (71 pac.)

Figura 11 .- Curva actuarial del tiempo de afectación ocular.

La frecuencia de uveítis refractaria fue semejante en hombres y mujeres pero la edad de aparición fue más precoz en los primeros (tabla 13); también eran varones la mayoría de pacientes con amaurosis (5 varones y 1 mujer).

TABLA 13
PATOLOGIA OCULAR III

UVEITIS REFRACTARIA (24 CASOS)	HOMBRE:13		MUJER:11		p
	M	DS	M	DS	
EDAD DE COMIENZO	22,9	7,3	29,5	11	0,13
EDAD AFECCION OCULAR	24,8	8	34	12	0,05
TIEMPO DE APARICION (*)	1,9	3	4,7	9,9	0,4
FRECUENCIA	54 %		46 %		

(*) A partir del primer síntoma.

B) SINTOMATOLOGIA CUTANEA

Se detectó en 43 pacientes (63%). Su distribución figura en la tabla 14. La lesión más frecuente fue la foliculitis en 25 casos. Solo se consideró elemento diagnóstico si el paciente no estaba sometido a tratamiento esteroideo y había rebasado la edad puberal. El eritema nodoso estaba presente en 22 pacientes y la tromboflebitis superficial en dos. Una paciente presentó lesiones con datos morfológico e histológicos de Síndrome de Sweet.

La distribución de la afección cutanea (tabla 14) fue similar entre ambos sexos, sin embargo, la mayoría de los

varones presentaron foliculitis (mucho más raramente eritema nodoso). En las mujeres con afección cutánea ocurría lo contrario, la mayoría presentaba eritema nodoso en menor proporción foliculitis (6 de 20, 30%). No había diferencia significativa de edad entre ambos grupos.

TABLA 14
PATOLOGIA CUTANEA

AFECCION CUTANEA	TOTAL		HOMBRE		MUJER		p
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	
GENERAL	45	63	25	55	20	45	1,542
FOLICULITIS	29	64	23	92	6	30	0,0001
ERITEMA NODOSO	23	51	9	36	14	70	0,036
TROMBOFLEB S.	2	3	1	2	1	2	NS
EDAD DE COMIE.	27,6(12)		25,6(12,4)		30,1(11,4)		0,214
RETRASO DIAG.	7(9,9)		4,4(5,8)		10,3(12,8)		0,071

En 23 pacientes se investigó la prueba de patergia. La técnica empleada fue la de Dilsen (7). La respuesta macroscópica se valoró a las 48 horas y se hizo biopsia mediante punch. Solo se detectó una lesión macroscópica poco llamativa en 4 pacientes, y en ninguno de ellos se observó pústula. Se apreció infiltrado por neutrófilos en 9 pacientes (39%), infiltrado linfocitocitario en 6 (26%) y leucocitoclasia en 6 (26%).

C) SINTOMATOLOGIA ARTICULAR

Cuarenta y dos pacientes (59 %) referían sintomatología articular. La patología más frecuente fue la artritis de rodillas, tobillos y carpos, siendo más frecuente la presentación oligoarticular que monoarticular. La participación de articulaciones coxofemoral, metatarso, codos, metacarpofalán-gicas e interfalángicas proximales fue mucho menos frecuente. (Tablas 15 y 16)

TABLA 15
 PATOLOGIA ARTICULAR I

ARTICULACIONES AFECTADAS	Nº	%
		42
RODILLAS	20	47,61
TOBILLOS	18	42,85
CADERAS	5	11,90
LUMBARES	2	4,54
METATARSOFALANGICA	1	2,38
CARPOS	14	33,33
CODOS	2	4,54
METACARPOFALANGICAS	1	2,38
INTERFALANGICAS PROXIMALES	1	2,38
POLIARTRITIS	1	2,38
POLIARTRALGIAS	1	2,38

TABLA 16
 PATOLOGIA ARTICULAR II

PATOLOGIA ARTICULAR	TOTAL		HOMBRE		MUJER		P
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	
	42	59	26	62	16	38	
EDAD COMIENZO	27 (12)		27,3 (13)		27 (9,6)		0,97
RETRASO DIAGNOSTICO	6,9 (8,5)		6,4 (8,6)		7,7 (9,4)		0,6

D) SINTOMATOLOGIA NEUROLOGICA

Se constató patología neurológica en 13 pacientes. La manifestación más frecuente fue la meningitis en 5 casos, en uno de ellos acompañado de patología focal y en otro, de curso recidivante (3 episodios). Tres pacientes presentaron patología comicial, todos como única manifestación neurológica. Cinco pacientes presentaron lesiones encefálicas focales o difusas (encefalitis, en dos pacientes), y en tres de ellos se constataron en la TAC y/o resonancia nuclear magnética. En 3 pacientes se detectó, clínicamente y mediante electromiografía, afección del nervio mediano. En 7 de estos pacientes había patología ocular asociada (Tabla 17).

TABLA 17
 PATOLOGIA NEUROLOGICA

	TOTAL		HOMBRE		MUJER		
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	
AFECCION SNC	14	20	8	57	6	43	
MENINGITIS	6	43	4	50	2	33	
EPILEPSIA	3	21	1	12	2	33	
LESIONES FOCALES	5	36	5	62	1	16	
ENCEFALITIS	2	14	2	25	0	0	
DATOS EPIDEMIO.	M	DS	M	DS	M	DS	p
EDAD INICIO	29,5	7,5	28,2	5,6	32	11,2	0,5
RETRASO DIAGNOSTICO	11,3	11,8	4,75	5,5	16,2	13,3	0,12

E) SINTOMATOLOGIA DIGESTIVA

Nueve pacientes presentaban patología digestiva, siendo la más frecuente la úlcera gastroduodenal (4 pacientes).

Había antecedentes o se comprobó hemorragia digestiva en 5 pacientes. En una paciente se repitió en dos ocasiones y se realizó endoscopia que presentó erosiones superficiales en segunda porción duodenal. En otros 2 pacientes se comprobó la existencia de afección de intestino delgado. El primero, con lesiones en yeyuno, precisó ser intervenido en dos ocasiones por cuadros de obstrucción y sangrado oculto; el estudio histológico puso de manifiesto úlceras planas con datos de vasculitis con depósito de IgG, IgA e IgM. El otro paciente

sufrió un cuadro de rectorragias, diarrea y fiebre; el tránsito intestinal puso de manifiesto úlceras planas, en anillo de sello, en íleon terminal. Otro de los episodios de hemorragia digestiva era secundario a lesiones aftosas en intestino grueso que se biopsiaron comprobándose que correspondían a lesiones vasculíticas.

Cinco de los pacientes eran hombres. La edad media de los pacientes con patología digestiva fue mayor que el promedio de la serie (44 a en el momento del diagnóstico y 33 al inicio de la enfermedad). En este grupo de pacientes la edad media de las mujeres fue inferior (28 al inicio de la enfermedad y 40 en le momento del diagnóstico) que la de los varones (37 al inicio de la enfermedad y 47 en el momento del diagnóstico). (Tabla 18).

TABLA 18

PATOLOGIA DIGESTIVA

PATOLOGIA DIGESTIVA	TOTAL		HOMBRE		MUJER		p
	9		5	55 %	4	45 %	
	M	DS	M	DS	M	DS	
EDAD DE COMI- ENZO	32,7	13,4	37	13,8	25,5	12,5	0,317
RETRASO DIAGNOSTICO	11,5	13,7	10,4	13,9	13	15,5	0,803

F) OTROS DATOS CLINICOS

Se constató patología venosa en 11 pacientes. Tres pacientes sufrieron tromboembolismo pulmonar y otro una trombo-sis de la vena cava inferior (Tabla 19). Solo 2 de los 11 pacientes presentaron tromboflebitis superficial.

TABLA 19
PATOLOGIA TROMBOTICA

PATOLOGIA TROMBOTICA	TOTAL		HOMBRE		MUJER		p
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	
	11	15	6	56	5	46	
EDAD COMIENZO	33		34		32		NS
RETRASO DIAGNOSTICO	6		5		6		NS

Ocho pacientes sufrieron episodios recidivantes de epididimitis.

Sólo en tres casos había antecedentes inequívocos de historia familiar de enfermedad de Behçet pero fue muy frecuente la existencia de aftosis oral recidivante en muchos de los familiares de los pacientes incluidos en la serie.

Un paciente sufrió un infiltrado pulmonar. Se descartó causa infecciosa de la misma y evolucionó favorablemente con tratamiento esteroideo.



Dos pacientes desarrollaron una tuberculosis pulmonar durante el curso de su enfermedad. Uno estaba sometido a tratamiento con corticoesteroides y el otro no.

Una paciente presentó una glomerulonefritis mesangial proliferativa con evolución a la insuficiencia renal crónica.

4.3.- DATOS ANALITICOS

No hubo ninguna alteración analítica, especialmente destacable, que pudiera relacionarse con la EB ni con el grado de actividad de la misma (Tabla 20). La VSG y la PCR estaban elevados en el 26 % y en el 36 % de los pacientes respectivamente. La concentración sérica de crioglobulinas estaba elevada en 16 %. En 21 pacientes se realizó estudio de inhibidor circulante de coagulación; en 5 de ellos se encontraron valores de anticuerpos anticardiolipina elevados (3 de estos pacientes presentaron patología trombótica: concretamente 2 con trombosis venosa profunda de MMII, uno con tromboembolismo pulmonar y otro con infarto de miocardio); ninguno de ellos presentaba vasculitis retiniana.

TABLA 20
DATOS ANALITICOS

DATOS ANALITICOS	Nº	%	T
VSG elevada	17	25,75	66
ANEMIA	4	6,06	66
LEUCOCITOSIS	3	4,61	65
HIPERGAMMAGLOBULINEMIA	5	7,93	63
FACTOR REUMATOIDE	1	1,66	60
ASLO	8	1,11	61
PCR	22	36,06	61
CRIOGLOBULINAS	8	16,32	54
HBsAG	1	2,22	44
TEST TUBERCULINA	14	28,57	49
DESCENSO DE C3	0	0	54
DESCENSO DE C4	3	5,55	54
ANTICOAGULANTE LUPICO, ACA	5	23,80	21
ANTICUERPOS ANTINUCLEARES	26	40,00	65
= 1/20	13	20,00	
= 1/40	8	12,30	
= 1/80	1	1,53	
= 1/160	3	4,61	
= 1/320	1	1,53	

La reacción tuberculínica fue positiva en el 28,57 % de los casos. Los resultados de los estudios serológicos relativos a virus herpes simple (VHS-1) y citomegalovirus figuran en la tabla 21 y los del virus de hepatitis B en la tabla 20.

TABLA 21

COMPARACION DE TITULOS DE SEROLOGIA DE VHS1 Y CMV EN PACIENTES CON EB FRENTE A CONTROLES

TITULO	VHS1-p (67)	VHS1-c (40)	p	CMV-p (67)	CMV-c (40)	p
0	20(30%)	18(45%)	0,339	37(61%)	22(55%)	0,570
1/8	0	0		1(2%)	3(7%)	0,146
1/16	16(24%)	15(37%)	0,186	9(13%)	11(27%)	0,321
1/32	12(18%)	6(15%)	0,749	6(9%)	3(14%)	0,549
1/64	10(15%)	1(2%)	0,050*	7(10%)	1(2%)	0,254
>1/64	8(12%)	0	0,020*	5(7%)	0	0,254

4.4.- MOLECULAS HLA

A) MOLECULAS DE CLASE I

Se estudiaron en 67 pacientes y se compararon las diferencias de sus respectivas frecuencias entre pacientes y una población control de 223 sujetos sanos. Se estimó el riesgo relativo mediante la fórmula de Wolff y Haldane en el total de pacientes y en los grupos de pacientes estratificados según la sintomatología (ocular, cutánea, articular, neurológica, digestiva, trombótica, epididimitis). En la tabla 22 se registran todas las moléculas de clase I y II de cada uno de los pacientes.

TABLA 22

MOLECULAS HLA DE CLASE I Y II EN 67 PACIENTES CON EB

<u>Reg N</u>	<u>HLA-A</u>	<u>HLA-B</u>	<u>DRB1</u>	<u>DORB1</u>
1	A29,A31	B14,B44	4,07	0201,0303
2	A02,-	B14,B62	17,01	0201,0501
3	A02,A24	B35,B44	15,4	0303,0602
4	A02,A26	B17,B45	4,07	0201,302
5	A11,A32	B51,B44	11,13	0301,603
6	A03,-	B07,B51	01,4	0301,501
7	A02,A28	B51,B08	NR	NR
8	A02,-	B18,B50	17,11	0201,301
9	A02,A24	B51,-	NR	NR
10	A02,-	B51,B60	4,11	0301,302
12	A33,-	B44,-	07,4	0201,302
13	A09,A10	B15,-	07,11	0201,301
14	A02,-	B07,B62	6,07	0201,603
15	A24,-	B35,B51	11,12	0301,-
18	A24,A26	B44,B62	4,6	0301,603
19	A30,A33	B14,B27	01,6	0501,-
20	A09,-	B21,B44	01,6	0501,-
21	A01,A24	B44,B51	11,4	0301,-
22	A01,A03	B08,B50	NR	NR
23	A09,A30	B44,-	07,11	NR
24	A03,A23	B07,B44	15,07	0201,602
25	A02,A03	B07,B45	8,10	0402,501
26	A03,A26	B07,B27	NR	NR
27	A24,A29	B44,B51	6,07	0201,603
28	A01,A28	B51,B8	4,-	0301,302
29	A01,A02	B08,B27	6,11	0301,501
30	A01,A29	B53,B44	4,07	0303,201
31	A02,-	B07,B62	6,07	0201,604
32	A02,A28	B14,B51	11,6	0301,604
33	A32,-	B53,-	07,11	NR
34	A01,A29	B44,B17	NR	NR
35	A02,A30	B27,B60	15,17	0201,601
36	A01,A26	B08,B40	NR	NR
37	A01,A03	B08,B18	10,17	0201,501

TABLA 22 - (CONTINUACION)

MOLECULAS HLA DE CLASE I Y II EN 67 PACIENTES CON EB

<u>Reg N</u>	<u>HLA-A</u>	<u>HLA-B</u>	<u>DRB1</u>	<u>DORB1</u>
38	A02,A24	B35,B51	17,11	0201,0301
39	A02,A23	B44,B51	6,07	NR
40	A02,A03	B35,B50	6,11	0301,0602
41	A02,A26	B14,B44	07,-	0201,-
42	A02,A25	B39,B58	15,11	0301,0502
43	A29,A31	B17,B51	4,8	0301,0402
44	A01,-	B44,B57	07,-	0201,0303
45	A02,A11	B44,B51	11,07	0201,0301
46	A29,A11	B18,B51	15,17	0201,602
47	A02,A11	B51,B50	01,6	0501,0603
48	A01,A02	B44,B51	15,6	0501,0602
49	A02,-	B44,B49	11,-	NR
50	A11,A68	B18,B62	NR	NR
51	A24,A26	B35,B53	15,13	NR
52	A26,A30	B18,B49	17,-	0201,-
53	A02,A29	B14,B51	4,11	0301,0303
54	A03,A26	B14,B44	07,-	0201,-
55	A02,-	B45,B51	6,07	0201,0603
56	A01,A33	B08,-	17,-	0201,-
57	A30,A33	B14,B18	01,17	0201,0501
58	A01,A02	B17,B51	15,11	0301,0602
59	A02,A23	B18,B51	17,4	0201,0301
60	A01,A24	B39,B52	15,8	0601,0402
61	A30,-	B35,B60	01,04	0302,0501
62	A02,A30	B18,-	NR	NR
63	A02,A03	B14,B35	17,11	NR
64	A02,A26	B07,B51	13,-	NR
65	A01,A02	B08,B61	NR	NR
66	A26,A29	B44,B56	NR	NR
67	A02,A24	B17,B51	07,11	0301,0303
68	A02,A28	B27,B56	NR	NR
69	A02,A30	B07,B18	NR	NR
70	A01,A32	B27,B62	NR	NR

NR= No realizado.

a) Moléculas HLA-A

Ninguna de las moléculas tenía una distribución significativamente diferente entre controles y el total de pacientes con EB (Tabla 23). Por el contrario, en algunos subgrupos, se encontró una frecuencia distinta de la esperada (la de A29 es menor en la serie cutánea y SNC; la de A24 es menor en la articular (Tabla 31)).

TABLA 23

RIESGO RELATIVO CONFERIDO POR MOLECULAS HLA-A
EN PACIENTES CON EB

HLAI	CONTROL (223)	PACIENTES (67)	RIESGO RELATIVO	p
A1	45 (20,1%)	15 (22,4%)	1,1	0,732
A2	92 (41,2%)	33 (49,2%)	1,3	0,263
A3	42 (18,8%)	9 (13,4%)	0,6	0,204
A11	23 (10,3%)	5 (7,4%)	0,7	0,334
A9	3 (1,3%)	3 (4,5%)	3,4	0,139
A23	9 (4,0%)	3 (4,5%)	1,1	0,552
A24	44 (19,7%)	10 (14,9%)	0,7	0,243
A10	4 (1,8%)	1 (1,5%)	0,8	0,673
A25	9 (4,0%)	1 (1,5%)	0,3	0,463
A26	18 (8,1%)	10 (15,0%)	1,9	0,103
A28	20 (8,9%)	4 (5,9%)	0,6	0,309
A29	40 (17,9%)	8 (11,9%)	0,6	0,166
A30	30 (13,4%)	8 (11,9%)	0,8	0,465
A31	12 (5,4%)	2 (2,9%)	0,5	0,534
A32	17 (7,6%)	3 (4,5%)	0,5	0,582
A33	12 (5,4%)	4 (5,9%)	1,1	0,679

b) Moléculas HLA-B

En la serie total, la frecuencia de B51 estaba significativamente aumentada en pacientes con EB (Tabla 24). La frecuencia de esta molécula varió según el subgrupo de pacientes.

TABLA 24
RIESGO RELATIVO CONFERIDO POR MOLECULAS HLA-B
EN PACIENTES CON EB

HLAI	CONTROL (223)	PACIENTES (67)	RIESGO RELATIVO	p
B7	29 (13,0%)	8 (11,9%)	0,9	0,503
B8	23 (10,3%)	8 (11,9%)	1,1	0,659
B14	29 (13,0%)	9 (13,4%)	1,0	0,535
B18	36 (16,2%)	9 (13,4%)	0,8	0,373
B27	21 (9,4%)	6 (8,9%)	0,9	0,564
B35	41 (18,4%)	7 (10,4%)	0,5	0,086
B39	4 (1,8%)	2 (2,9%)	1,7	0,625
B44	77 (34,5%)	29 (29,8%)	0,8	0,197
B45	5 (2,2%)	3 (4,4%)	2,0	0,392
B21	2 (0,9%)	1 (1,5%)	1,7	0,544
B49	15 (6,7%)	2 (2,9%)	0,4	0,376
B50	8 (3,6%)	4 (5,9%)	1,7	0,482
B51	37 (16,6%)	23 (34,3%)	2,6	0,003*
B52	0	1 (1,5%)	1,7	0,504
B53	1 (0,4%)	3 (4,5%)	10,0	0,040
B56	2 (0,9%)	2 (2,9%)	3,4	0,229
B17	21 (9,4%)	7 (10,4%)	1,2	0,815
B40	18 (8,1%)	5 (7,4%)	0,9	0,554
B15	14 (6,8%)	7 (10,5%)	1,7	0,282

En los pacientes con patología ocular, cutánea y digestiva la frecuencia de B51 fue significativamente mayor que en los controles (Tabla 25).

TABLA 25

RIESGO RELATIVO CONFERIDO POR B51 EN PACIENTES CON EB SEGUN LAS MANIFESTACIONES CLINICAS EN RELACION A 223 CONTROLES (B51=37, 16,6%)

GRUPO	Nº	B51	%	RR	p
TOTAL	67	23	34,3	2,62	0,003*
AF. OCULAR	44	19	43,1	3,82	0,0001*
AF. CUTANEA	40	17	38,6	3,1	0,001*
ARTICULAR	38	12	29,3	2,0	0,075
AF. SNC	14	1	7,1	0,3	0,705
AF. TROMBOTICA	11	2	18,2	1,1	0,673
EPIDIDIMITIS	9	3	30,0	2,5	0,46
AF. DIGESTIVA	8	4	50,0	4,0	0,054*

En la patología ocular es donde la relación entre EB y B51 es más estrecha (Tabla 26). Cuando analizamos la frecuencia según varones y mujeres, valorando además la presencia de uveítis refractaria comprobamos que esta relación es máxima en varones con uveítis tanto si es refractaria o no. En las mujeres con uveítis se mantiene esta asociación algo por debajo del límite de la significación estadística y no existe en el caso de la uveítis refractaria. Por otro lado, en la mayoría de los subgrupos donde la frecuencia de B51 es alta, esta se correlaciona con patología ocular.

En los pacientes con patología articular o con epididimitis persistía dicha diferencia aunque sin alcanzar significación estadística. Por el contrario, en serie neurológica la frecuencia de B51 fue menor que en la población control, si bien no se alcanzó significación estadística (Tabla 25). No obstante, la comparación de la frecuencia de B51 entre ambas series, ocular y neurológica arroja una clara diferencia estadísticamente significativa ($p=0,011$).

TABLA 26

RIESGO RELATIVO CONFERIDO POR B51 EN PACIENTES CON EB Y UVEITIS EN RELACION A 223 CONTROLES (B51=37, 16,6%)

GRUPO	Nº	B51	%	RR	p
TOTAL	67	23	34,3	2,62	0,003*
VARONES	36	13	36,1	2,84	0,003*
MUJERES	31	10	32,2	2,39	0,047*
UVEITIS	44	19	43,1	3,82	0,0001*
UVEITIS VARON	24	12	50,0	5,02	0,0001*
UVEITIS MUJER	20	7	35,0	2,70	0,060
UVEITIS REFRACTARIA	24	9	37,5	3,01	0,0001*
UVEIT. REFRAC. VARON	13	7	53,8	5,86	0,004*
UVEIT. REFRAC. MUJER	11	2	18,1	1,11	0,575

El estudio de los datos clínicos y epidemiológicos de los pacientes con EB con y sin B51 muestra algunas diferencias. En los pacientes con B51+ la edad de comienzo de la enfermedad es más precoz, la afección ocular más frecuente y las neurológicas más rara en relación con los pacientes B51-

(Tabla 27). En el varón la relación de dichos parámetros con la positividad/negatividad de B51 es muy evidente. Por el contrario, en la mujer (al menos en nuestra serie) no hay una asociación clara entre B51+ y dichas circunstancias: inversamente, tanto los datos clínicos como epidemiológicos de las mujeres (independientemente de que sean o no B51+) son más parecidos a los del subgrupo B51- de la serie total (Tablas 28 y 29). Por ello decidimos analizar las diferencias entre varones B51+ y el resto de los pacientes con EB; fue entre estos dos grupos donde las diferencias eran más significativas: Los pacientes **varones B51+** inician la enfermedad a edad más temprana, en ellos el diagnóstico es más precoz, las lesiones oculares son más frecuentes y las manifestaciones neurológicas y trombóticas son más raras que en el resto de la población de los pacientes con EB (Tabla 30).

TABLA 27
DIFERENCIAS CLINICAS Y EPIDEMIOLOGICAS ENTRE
PACIENTES CON EB B51+ y B51-

	TOTAL: 67		B51(+): 23		B51(-): 44		p
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	
Af. Ocular	42	63	19	83	23	52	0,018
Af. Cutanea	41	61	17	74	24	54	0,187
Af. Artic.	38	81	12	52	26	59	0,613
Af. SNC	14	21	1	4	13	30	0,024
Epididimt.*	9	12	3	23	6	26	0,586
Trombofleb	11	16	2	9	9	20	0,307
Af. Digest	8	12	4	17	4	9	0,269
Uv. Refrac	21	31	9	39	12	28	0,492
DATOS EPIDEMIOLOGICOS			M	DS	M	DS	p
Edad de comienzo			24,9	8,9	29,6	12,3	0,082
Retraso diagnóstico			7,4	10,0	7,3	9,6	0,978

*Calculado en 36 varones, 13 B51+ y 23 B51-

TABLA 28
 DIFERENCIAS CLINICAS Y EPIDEMIOLOGICAS ENTRE
 VARONES Y MUJERES CON EB B51+

	B51+ : 23		HOMBRE 13		MUJER 10		p
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	
Af. Ocular	19	83	12	92	7	54	0,281
Af. Cutanea	17	74	10	78	7	70	0,537
Af. Artic.	12	52	8	61	4	40	0,273
Af. SNC	1	4	0	0	1	10	0,435
Trombofleb	2	9	0	0	2	20	0,178
Af. Digest	4	17	1	8	3	30	0,281
Uv. Refrac	9	39	7	54	2	20	0,197
DATOS EPIDEMIOLOGICOS			M	DS	M	DS	p
Edad de comienzo			22,0	7,5	28,0	9,7	0,100
Retraso diagnóstico			3,6	5,0	12,0	13,0	0,079

* Calculado en 36 varones, 13 B51+ y 23 B51-

TABLA 29
 DIFERENCIAS CLINICAS Y EPIDEMIOLOGICAS ENTRE
 VARONES Y MUJERES CON EB B51-

	B51(-) :44		HOMBRE :23		MUJER: 21		p
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	
Af. Ocular	23	52	11	47	12	57	0,563
Af. Cutanea	24	54	12	52	12	57	0,771
Af. Artic.	26	59	15	65	11	53	0,541
Af. SNC	13	30	8	53	5	24	0,518
Trombofleb	9	20	6	26	2	10	0,245
Af. Digest	4	9	3	6	1	5	0,609
Uv. Refrac	12	28	2	20	6	26	0,342
<u>DATOS EPIDEMIOLOGICOS</u>			M	DS	M	DS	p
Edad de comienzo			28,0	11,0	30,9	13,0	0,518
Retraso diagnóstico			5,8	8,0	9,0	10,8	0,280

* Calculado en 36 varones, 13 B51+ y 23 B51-

TABLA 30

DIFERENCIAS CLINICAS Y EPIDEMIOLOGICAS ENTRE
VARONES B51+ Y EL RESTO DE LOS PACIENTES CON EB

	HOMBRE B51+:13		RESTO DE LOS PACIENTES:54		p
	Nº	%	Nº	%	
Af. Ocular	12	92	30	55	0,023*
Af. Cutanea	10	78	31	57	0,225
Af. Artic.	8	61	30	55	0,764
Af. SNC	0	0	14	30	0,033*
Epididimt.*	3	12	6	26	0,525
Trombofleb	0	0	11	20	0,074
Af. Digest	1	8	7	13	0,513
Uv. Refrac	7	54	17	31	0,197
DATOS EPIDEMIOLOGICOS	M	DS	M	DS	p
Edad de comienzo	22,3	7,5	29,3	11,8	0,012*
Retraso diagnóstico	3,7	5,7	8,27	10,4	0,038*

* Calculado en 36 varones, 13 B51+ y 23 B51-

La frecuencia de B15 (englobando sus dos subtipo, B62 y B63) en la serie total, no difería entre pacientes y controles. No obstante, dentro de la serie EB la distribución de B15 era, por lo general, inversa a la de B51: más frecuente en los subgrupos con afección articular y de SNC (en los que B51 no difiere significativamente de la serie control) y más rara en la serie ocular. Así, de los 7 pacientes B15+, 5 presentaban patología articular, 3 patología neurológica, 2 patología trombótica y 2 patología cutánea; solo 1 de estos

pacientes tenía afección ocular (en este paciente también estaba presente B51) (Tabla 31). Estas diferencias, entre grupos sindrómicos, alcanzan significación estadística: $p=0,040$ (serie SNS/serie ocular) y $p=0,049$ (serie articular/serie ocular).

No se realizó análisis independiente de los dos subtipos de B15 porque no se contaba con dicha discriminación en la mayoría de la muestra control. De todas maneras, en la población española, la mayoría de los individuos B15 poseen el "subtipo" B62 (circunstancia que también comprobamos en nuestra serie de pacientes en los que B62 representa el 100 % de los individuos B15+).

Otros 2 antígenos codificados por el locus B presentan una asociación curiosa con determinados grupos clínicos: B45 aparece en 2 de los 11 pacientes de la serie trombótica; este porcentaje no es muy alto (18,2 %) pero llama la atención si se compara con la escasísima frecuencia con la que se observa en la serie control (2,2 %, muy semejante a la que comprueban estudios de otros autores); esto condiciona una importante significación estadística ($p=0,037$) aunque carezca de significación práctica. De forma semejante, B53 aparece en 2 de los 14 pacientes de la serie SNC (14,4 %) y sólo en 1 (0,14 %) de los controles ($p=0,009$) (Tabla 24). Sin embargo con técnicas serológicas es muy difícil discriminar entre B35 y

B53; para distinguirlos hay que diferenciarlos a través de la distinción del sistema dialélico Bw4/Bw6. Esta discriminación estaba realizada en el total de pacientes pero no en los controles por lo que esta diferencia no no es del todo fiable.

TABLA 31

RIESGO RELATIVO CONFERIDO POR MOLECULAS HLA A Y B EN
PACIENTES CON EB ESTRATIFICADOS POR SINTOMATOLOGIA

HLAI	CONTR(223)	S.OCUL(42)	RR	p
B51	37 (16,6%)	19 (43,1%)	3,8	0.0005
B15	1 (6,3%)	1 (2,38%)	0,4	>0,3

HLAI	CONTR(223)	S.ART (38)	RR	p
A24	44 (19,7%)	3 (7,89%)	0,3	0,056
B51	37 (16,6%)	12 (29,27%)	2,0	0.075
B15	6 (6,3%)	6 (15,8%)	2,8	0,052

HLAI	CONTR(223)	S. SNC (14)	RR	p
A29	40 (18%)	0	0,3	0,0001
B51	37 (16,6%)	1 (7,14%)	0,3	0,705
B53	1 (0,4%)	2 (14,3%)	36,9	0,009
B15	14 (6,3%)	3 (21,43%)	4,0	0,068

HLAI	CONT(223)	S.CUT (41)	RR	p
A29	40(18%)	3 (7%9)	0,3	0,041
B51	37(16,6%)	17 (38,64%)	3,1	0.001
B15	14 (6,3%)	3 (7,32%)	1,1	>0,3

HLAI	CONT(223)	S.TRO (11)	RR	p
B45	5 (2,2%)	2 (18,2%)	0,1	0,037
B51	37 (16,6%)	2 (18,2%)	1,1	0.673
B15	14 (6,3%)	2 (18,2%)	3,3	0,168

HLAI	CONT(223)	S.EPID (9)	RR	p
B51	37 (16,6%)	3 (30%)	2,5	0.46
B15	14 (6,3%)	0	0,7	>0,3

HLAI	CONT(223)	S.DIG (8)	RR	p
B51	37 (16,6%)	4 (44,4%)	4,0	0.054
B15	14 (6,3%)	0	0,8	>0,3

B) MOLECULAS DE CLASE II

En 47 pacientes se estudió la frecuencia de DR y DQ. En una fase inicial se emplearon técnicas serológicas. Posteriormente, este primer análisis se sometió a confirmación mediante técnica de oligotyping relativa a los respectivos alelos codificantes (para DRB1 genérico y DQB1) con lo que la distribución de especificidades de clase II sufrió algunas variaciones (especialmente en lo que se refiere a moléculas codificadas por DQB1).

Como para las de clase I, también se estimó el riesgo relativo conferido por cada una de estas moléculas (globalmente y para pacientes estratificados en función de la sintomatología) con referencia a una serie control de 189 sujetos sanos no relacionados.

a) Moléculas DR

La distribución de las frecuencias antigénicas DR en la serie total no difería significativamente de la que se observó en la serie control (Tabla 32). Sin embargo, en la serie ocular se observa asociación positiva con DRB1*4 cuya frecuencia es el doble de la observada en controles, y, en la serie SNC, asociación positiva con DRB1*10 (Tabla 36).

TABLA 32

RIESGO RELATIVO CONFERIDO POR ALELOS
DR GENERICO EN PACIENTES CON EB

HLA II	CONTROL(189)	PACIENTES(47)	RR	p
DRB1*1	42 (22,2%)	7 (14,8%)	0,6	0,183
DRB1*2	46 (24,3%)	8 (17,0%)	0,6	0,114
DRB1*3	45 (23,8%)	10 (21,2%)	0,8	0,439
DRB1*4	43 (22,7%)	14 (29,8%)	1,4	0,343
DRB1*11	46 (24,3%)	15 (31,9%)	1,4	0,352
DRB1*12	5 (2,6%)	1 (2,1%)	0,8	0,657
DRB1*6	56 (29,6%)	13 (27,6%)	0,9	0,416
DRB1*7	49 (25,9%)	15 (31,9%)	1,3	0,464
DRB1*8	9 (4,8%)	3 (6,4%)	1,3	0,440
DRB1*9	3 (1,6%)	0 (0%)	0,5	0,565
DRB1*10	7 (3,7%)	2 (4,2%)	1,5	0,565

b) Alelos de DQB1

La distribución de las frecuencias de los alelos DQB1 fue también muy similar entre controles y pacientes de la serie total, salvo para DQB1*0303 que se asociaba positivamente aunque no llega a alcanzarse el límite preestablecido de significación estadística ($p=0,084$; $RR=2,9$) y DQB1*0503 que se asociaba negativamente en el límite de la significación estadística ($p= 0,051$ y $RR= 0,13$) (Tabla 33).

TABLA 33
RIESGO CONFERIDO POR ALELOS DQB1
EN PACIENTES CON EB

HLA II	CONTROL(189)	PACIENT.(47)	R.R.	p
DQB1*0501	52 (27,5%)	11 (23,4%)	0,8	0,356
DQB1*0502	9 (4,8%)	1 (2,1%)	0,4	0,691
DQB1*0503	13 (6,8%)	0 (0%)	0,1	0,051*
DQB1*0601	4 (2,1%)	2 (4,3%)	2,0	0,343
DQB1*0602	31 (16,4%)	6 (12,7%)	0,7	0,359
DQB1*0603	26 (13,6%)	6 (12,7%)	0,9	0,538
DQB1*0604	18 (9,5%)	2 (4,2%)	0,4	0,197
DQB1*0201	83 (43,9%)	24 (51,06%)	1,3	0,415
DQB1*0301	57 (30,1%)	20 (42,5%)	1,7	0,119
DQB1*0302	26 (13,8%)	5 (10,6%)	0,7	0,386
DQB1*0303	9 (4,8%)	6 (12,7%)	2,9	0,086*
DQB1*0401	0 (0%)	0 (0%)		
DQB1*0402	11 (5,8%)	3 (6,4%)	1,1	0,554

Cuando se consideró conjuntamente la suma de los alelos que codifican moléculas DQ se obtuvieron resultados importantes: DQ5 (DQB1*0501+DQB1*0502+DQB1*0503) se asoció negativamente a EB, aunque también en el límite de significación estadística (Tabla 34).

TABLA 34
RIESGO CONFERIDO POR SUMA DE ALELOS DQB1
EN PACIENTES CON EB

HLA II	CONTROL(189)	PACIENT. (47)	RR	p
DQB1*0501	72 (38,1%)	12 (25,5%)	0,5	0,057*
DQB1*0502				
DQB1*0503				
DQB1*0601	74 (39,5%)	16 (34,04%)	0,8	0,319
DQB1*0602				
DQB1*0603				
DQB1*0604				
DQB1*0201	83 (43,9%)	24 (51,06%)	1,3	0,623
DQB1*0301	85 (44,9%)	27 (57,4%)	1,6	0,157
DQB1*0302				
DQB1*0303				
DQB1*0401	11 (5,8%)	3 (6,4%)	1,1	0,554
DQB1*0402				

En la estratificación por grupos sintomáticos se observó:

- En el grupo de pacientes con uveítis refractaria (Tabla 35) asociación positiva con DQB1*0303 (RR=6,1) con clara significación estadística ($p=0,014$). Esta asociación no se detectó en el total de pacientes con uveítis, por tanto, este alelo se comporta como un marcador específico de uveítis de mala evolución. También se comprobó asociación positiva con DQB1*0601 (RR=6,1), aunque sin alcanzar significación estadística ($p=0,079$).

- En los pacientes con patología cutánea (Tabla 36) se comprobó asociación positiva con DQB1*0301 y negativa con la suma de los alelos que codifican para DQ5.

- En los pacientes con patología articular (Tabla 36) asociación negativa con la suma de alelos que codifican para DQ5 (aunque en el límite de significación).

TABLA 35

RIESGO RELATIVO CONFERIDO POR DQB1 EN PACIENTES
CON EB Y UVEITIS REFRACTARIA

HLA II	CONTROL(189)	UV REF(17)	RR	p
DQB1*0501	52 (27,5%)	4 (23,5%)	0,8	0,945
DQB1*0502	9 (4,8%)	0 (0%)	0,5	0,453
DQB1*0503	13 (6,8%)	0 (0%)	0,3	0,315
DQB1*0601	4 (2,1%)	2 (11,7%)	6,1	0,079
DQB1*0602	31 (16,4%)	3 (17,6%)	1,0	0,557
DQB1*0603	26 (13,6%)	0 (0%)	0,1	0,091
DQB1*0604	18 (9,57%)	0 (0%)	0,2	0,180
DQB1*0201	83 (43,9%)	7(41,1%)	0,9	0,518
DQB1*0301	57 (30,1%)	8 (47,0%)	2,0	0,157
DQB1*0302	26 (13,8%)	2 (11,7%)	0,8	0,585
DQB1*0303	9 (4,8%)	4 (23,5%)	6,1	0,014*
DQB1*0401	0 (0%)	0 (0%)		
DQB1*0402	11 (5,8%)	1 (5,8%)	1,0	0,655

TABLA 36

RIESGO RELATIVO CONFERIDO POR ALELOS DR O DQ EN PACIENTES
ESTRATIFICADOS POR SINTOMATOLOGIA

HLA II	CONTROL(189)	S. OCUL(32)	RR	p
DRB1*4	43 (22,7%)	12 (37,5%)	2,3	0,083

HLA II	CONTROL(189)	S. CUT (29)	RR	p
DQB1*0301	57 (30,1%)	14 (48,2%)	2,1	0,059
DQB1*0501	72 (38,1%)	5 (17,24%)	0,3	0,036
DQB1*0502				
DQB1*0503				

HLA II	CONTROL(189)	S. ARTIC(26)	RR	p
DQB1*0501	72 (38,1%)	5 (19,23%)	0,4	0,080
DQB1*0502				
DQB1*0503				

HLA II	CONTROL(189)	S. SNC (7)	RR	p
DRB1*10	7 (3,7%)	2 (28,5%)	10	0,035

Además se compararon las frecuencias alélicas de DRB1 y DQB1 entre los 19 pacientes B51+ y 31 controles B51+. En pacientes B51+ la frecuencia de DR11 era mayor aunque no de forma significativa (tabla 37). DQB1*0301 estaba significativamente aumentado (tabla 38) y la suma de alelos que codifican para DQ5 disminuidos en el límite de la significación estadística (tabla 39).

TABLA 37

FRECUENCIA DE ALELOS DRB1 (GENÉRICO) EN PACIENTES CON EB B51+ Y CONTROLES B51+

HLA II	CONTROL(31)	PACIENTES(19)	RR	p
DRB1*1	10 (32,2%)	2 (10,5%)	0,2	0,100
DRB1*2	11 (35,5%)	3 (15,8%)	0,3	0,197
DRB1*3	4 (12,9%)	3 (15,8%)	1,2	0,543
DRB1*4	9 (29,0%)	7 (36,8%)	1,4	0,756
DRB1*11	9 (29,0%)	10 (52,6%)	2,7	0,135
DRB1*12	1 (3,2%)	1 (5,2%)	1,6	0,620
DRB1*6	17 (54,8%)	6 (31,5%)	0,3	0,148
DRB1*7	8 (25,8%)	4 (21,0%)	0,7	0,490
DRB1*8	0 (0%)	1 (5,2%)	5,1	0,392
DRB1*9	1 (3,2%)	0 (0%)	0,5	0,620
DRB1*10	0 (0%)	0 (0%)		

TABLA 38

FRECUENCIA DE ALELOS DE DQB1 EN PACIENTES
CON EB B51+ Y CONTROLES B51+

HLA II	CONTROL(31)	PACIENT. (19)	R.R.	p
DQB1*0501	7 (22,5%)	3 (15,8%)	0,6	0,722
DQB1*0502	4 (12,9%)	0 (0,%)	1,2	0,137
DQB1*0503	3 (9,6%)	0 (0%)	0,2	0,229
DQB1*0601	5 (16,1%)	0 (0%)	0,1	0,080
DQB1*0602	3 (9,6%)	3 (15,8%)	1,7	0,661
DQB1*0603	5 (16,1%)	4 (21,0%)	1,3	0,715
DQB1*0604	4 (12,9%)	1 (5,2%)	0,3	0,362
DQB1*0201	10 (32,2%)	6 (31,5%)	0,9	0,793
DQB1*0301	11 (35,5%)	14 (73,6%)	5,0	0,011*
DQB1*0302	8 (25,8%)	2 (10,5%)	0,3	0,282
DQB1*0303	1 (3,2%)	2 (10,5%)	3,5	0,549
DQB1*0401	0 (0%)	0 (0%)		
DQB1*0402	0 (0%)	0 (0%)		

TABLA 39

FRECUENCIA DE LA SUMA DE ALELOS DE DQB1 EN PACIENTES
CON EB B51+ Y CONTROLES B51+

HLA II	CONTROL(31)	PACIENT.(19)	R.R.	p
DQB1*0501	14 (45,1%)	3 (15,8%)	0,2	0,063*
DQB1*0502				
DQB1*0503				
DQB1*0601	17 (54,8%)	8 (42,1%)	0,6	0,767
DQB1*0602				
DQB1*0603				
DQB1*0604				
DQB1*0201	10 (32,2%)	6 (31,5%)	0,9	0,767
DQB1*0301	20 (64,5%)	14 (73,7%)	1,5	0,549
DQB1*0302				
DQB1*0303				
DQB1*0401	0 (0%)	0 (0%)		
DQB1*0402				

Al analizar la frecuencia de los alelos HLA-II en las distintas muestras de pacientes y controles con y sin B51 se compureba (tabla 40):

- DR11 tiene una distribución similar entre total de pacientes y controles. Sin embargo existe una clara tendencia a la asociación positiva entre B51 y DR11, tanto en el grupo de pacientes como en el de controles, llegando a alcanzar significación estadística en el grupo de pacientes.

- DQB1*301 tambien tiene un distribución similar en ambos grupos, de pacientes y de controles; y también tiende a asociarse a B51, igualmente de forma claramente significativa en la población de pacientes.

- DRB1*0201, tiene una frecuencia similar entre pacientes y controles, y tiende a asociarse negativamente a B51. Esta distribución anómala es semejante, no obstante, en las dos muestras (pacientes y controles).

TABLA 40

FRECUENCIA DE ALELOS HLA-II EN PACIENTES
Y CONTROLES B51+ Y B51-

HLA II	CONTROLES TOTAL (189)	PACIENTES TOTAL (47)	RR	p
DRB1*11	46 (24,3%)	15 (31,9%)	1,4	0,352
DQB1*0201	83 (43,9%)	24 (51,0%)	1,3	0,415
DQB1*0301	57 (30,1%)	20 (42,5%)	1,7	0,119
HLA II	PACIENTES B51- (28)	PACIENTES B51+ (19)	RR	p
DRB1*11	5 (17,8%)	10 (52,6%)	5,1	0,024
DQB1*0201	18 (64,8%)	6 (31,5%)	0,2	0,039
DQB1*0301	6 (21,4%)	14 (73,6%)	10	0,001
HLA II	CONTROLES B51+ (31)	PACIENTES B51+ (19)	RR	p
DRB1*11	8 (25,8%)	10 (52,6%)	3,1	0,073
DQB1*0201	10 (35,5%)	6 (31,5%)	0,9	0,793
DQB1*0301	11 (35,5%)	14 (73,6%)	5,0	0,011
HLA II	CONTROLES TOTAL (189)	PACIENTES B51+ (19)	RR	p
DRB1*11	46 (24,3%)	10 (52,6%)	3,4	0,013
DQB1*0201	83 (43,9%)	6 (31,5%)	0,6	0,340
DQB1*0301	57 (30,1%)	14 (73,6%)	6,5	0,0001
HLA II	CONTROLES TOTAL (189)	PACIENTES B51- (28)	RR	P
DRB1*11	46 (24,3%)	5 (17,8%)	0,6	0,312
DQB1*0201	83 (43,9%)	18 (64,2%)	2,2	0,066
DQB1*0301	57 (30,1%)	6 (21,4%)	0,6	0,468

- La suma de alelos que codifican DQ5 se asocia negativamente a B51 exclusivamente en pacientes aunque en el límite de la significación estadística (tabla 41).

TABLA 41

FRECUENCIA DE LA SUMA DE ALELOS DE DQB1
QUE CODIFICAN DQ5 EN PACIENTES
Y CONTROLES B51- Y B51+

HLA II	CONTROLES TOTALES (189)	PACIENTES TOTALES (47)	RR	p
DQ5	72 (38,1%)	12 (25,5%)	0,5	0,057
HLA II	PACIENTES B51- (28)	PACIENTES B51+ (19)	RR	p
DQ5	9 (32,1%)	3 (15,8%)	0,4	0,024
HLA II	CONTROLES B51+ (31)	PACIENTES B51+ (19)	RR	p
DQ5	14 (41,1%)	3 (15,8%)	0,2	0,063
HLA II	CONTROLES TOTALES (189)	PACIENTES B51+ (19)	RR	p
DQ5	72 (38,1%)	3 (15,8%)	0,3	0,077
HLA II	CONTROLES TOTALES (189)	PACIENTES B51- (28)	RR	p
DQ5	72 (38,1%)	9 (32,1%)	0,7	0,676

Finalmente se compararon las frecuencias de los haplotipos DR-DQ entre pacientes (considerados globalmente y estratificados por grupos sintomáticos) y controles. Solo se encontraron diferencias significativas con respecto al haplotipo DRB1*6-DQB1*0501, que fué más frecuente en el total de pacientes, sobre todo, en los grupos de uveitis y uveitis refractaria que en controles (tabla 42).

TABLA 42

FRECUENCIA DE HAPLOTIPOS DRB1*6-QB1*0501 EN EL GRUPO TOTAL DE PACIENTES, EN EL GRUPO DE UVEITIS Y DE UVEITIS REFRACTARIA CON EB FRENTE A CONTROLES

	CONTROLES	PACIENTES	p
DRB1*6	56	13	0,003
DRB1*6-DQB1*0501	1 (1,79%)	4 (30,77%)	
	CONTROLES	S.OCULAR	p
DRB1*6	56	8	0,005
DRB1*6-DQB1*0501	1 (1,79%)	3 (37,5%)	
	CONTROLES	UV.REFR	p
DRB1*6	56	2	0,002
DRB1*6-DQB1*0501	1 (1,79%)	2 (100%)	

DISCUSSION

5.- DISCUSION

La prevalencia de EB resultó, en nuestro estudio, mayor de lo esperado: 9 pacientes por 100.000. En España hay otros dos estudios de prevalencia que obtienen unos resultados más bajas (5,6/100.000 habitantes en Galicia (108) y 2/100.000 en las Islas Canarias (109)). Estos resultados son semejantes a los que se refieren a zonas de alta incidencia de EB, como Japón. En la relación varón mujer (V/M) hay un ligero predominio de varones (relación V/M= 1,2/1) y está próxima a la descrita por Ohsima (123) (1,7/1), es mucho mas baja que la comunicada en la mayoría de las series publicada en nuestro país (108, 124, 125, 126) salvo la de Bernardo Mateo (127); e intermedia entre las más alta descritas por Curth en Israel (4,6/1(17) y las mas bajas, en las que se invierte esta relación, con predominio de mujeres (0,4/1 y 0,7/1), descritas por Chamberlain (104) y O'Duffy (128) en Inglaterra y EEUU respectivamente. La edad de inicio de la enfermedad, 28 años, es también más precoz que la descrita en series españolas (108, 124, 126) salvo la de Rodríguez Illera (125) y similar a la de Oshima (123) y más baja que la existente en países anglosajones (104, 128).

Para la selección de enfermos no hemos utilizado exclusivamente los criterios recientemente establecidos por el Comité Internacional para el estudio de la Enfermedad de

Behçet (9) que, según sus autores, aportan una mayor sensibilidad y especificidad que los sistemas de criterios previamente establecidos. Como ya hemos mencionado, consideran como elementos diagnósticos la presencia simultánea de más de dos de las manifestaciones clásicas (aftas orales, aftas genitales, afección ocular y lesiones cutáneas) añadiendo el fenómeno patérgico como otro elemento del mismo valor diagnóstico que las anteriores. Cualquiera de las manifestaciones clínicas mencionadas está presente en la muestra objeto de estudio en más del 50% de los casos mientras que el fenómeno patérgico no se encontró en ninguno de los pacientes en los que se investigó. En un estudio controlado previo realizamos una valoración macroscópica y microscópica del fenómeno patérgico (7) en el que no se observaron reacciones cutáneas valorables ni se apreciaron diferencias anatomopatológicas en la respuesta de pacientes y controles. No cuestionamos que este fenómeno sea altamente específico pero, evidentemente, en los pacientes con EB de nuestro entorno, no es una prueba sensible.

Sesenta y nueve de los 71 pacientes correspondían a la forma completa según los criterios de O'Duffy Goldstein (11). De los dos restantes (formas incompletas), uno cumplía además los criterios del Comité Japonés (9) de forma incompleta (en algunas series publicadas por Ohno, hasta el 42 % de los pacientes son formas incompletas según este sistema de crite-

rios (32)). El segundo paciente con forma incompleta presentaba aftas orales, uveítis, afección del SNC, tromboflebitis y afección digestiva; se había descartado cualquier otra patología que pudiera justificar esta sintomatología. Solo seis pacientes cumplían los criterios de O'Duffy de forma exclusiva; el resto cumplía, simultáneamente dos o más de los sistemas de criterios utilizados para el diagnóstico.

Tanto la frecuencia de las manifestaciones clínicas como los síntomas más frecuente al inicio de la enfermedad son muy similares a lo que hay descrito en la literatura.

De los datos analíticos analizados hay 2 que llaman la atención:

- Una alta frecuencia de test tuberculínico (25 %), mucho mayor que la que se describe en la población general española y que oscila entre un 3 y un 6 % para mayores de 14 años (129). Solo en 2 pacientes se documentó una tuberculosis activa. Hemos desarrollado un estudio, con control histológico, (aún sin concluir) encaminado a dilucidar si esta reacción es, realmente, un equivalente inespecífico de la reacción patérgica.

- Una mayor frecuencia de títulos altos de anticuerpos frente al virus del herpes simple tipo 1 comparados con con-

troles sanos (no se trata de un fenómeno inespecífico, ya que estas diferencias no ocurren en relación con otros virus comunes, como CMV). Ya hemos mencionado la probable implicación de este virus en la patogenia de la enfermedad y este dato es uno más de los que sustentan esta hipótesis (26).

De los resultados obtenidos en lo que respecta a asociación con alelos (o sus productos) del CMH, para clase I, solo B51 está claramente relacionado con la enfermedad. La frecuencia antigénica de B51 en nuestro medio (16%) es intermedia entre la que se describe en países de alta y baja incidencia de la EB como Japón (20) (30%) y los de países anglosajones (105) (10%) respectivamente. Como se ha comprobado en estudios previos B51 se correlaciona más estrechamente con patología ocular (130). Hasta ahora, B51 solo se había correlacionado con una edad de inicio más precoz (131) de la enfermedad pero no con la severidad de la patología ocular ni con otras manifestaciones de la enfermedad. Los datos clínicos y epidemiológicos de los pacientes B51 de nuestra serie muestran unas características bien definidas. B51 se comporta como un marcador de uveítis (tanto de formas graves como leves) en varones jóvenes, pero no en mujeres, y no tiene ninguna relación con las uveítis de mala evolución en mujeres. La ausencia de correlación entre B51 y patología ocular en la mujer ya estaba descrita en la literatura (102). La uveítis, en los pacientes B51, no es necesariamente más

grave, pero sí más frecuente y de aparición más precoz. Por tanto, B51, no solo es un marcador para un mayor riesgo de enfermedad de Behçet: se comporta además, muy especialmente, como indicador de un mayor riesgo de uveítis en pacientes varones jóvenes.

Cuando se analiza la correlación de B51 con otras manifestaciones de la EB (tabla 24) se comprueba que no se asocia con manifestaciones articulares, neurológicas, trombóticas ni con epididimitis. Por otro lado, al estratificar según categorías sindrómicas la presencia de B51 se correlaciona con la presencia concomitante de patología ocular. A la inversa, en los pacientes B51 positivos (sobre todo varones) en los que es muy común la afección ocular, las manifestaciones neurológicas son significativamente infrecuentes (tabla 30). En pacientes japoneses, Mishima (132) comunica un 8 % de afección neurológica, e Inaba (133) refiere la falta de asociación clínica entre patología ocular y neurológica en sus pacientes. En los países donde la correlación entre EB y B51 es menor, como Estados Unidos, Goldstein refiere una frecuencia de patología neurológica mayor (42%), una edad de comienzo alta y un mayor predominio de mujeres (41).

No hay ninguna otra molécula HLA-I tan claramente vinculada a la enfermedad. Los datos existentes en la literatura, con respectos a moléculas HLA-I distintas de B51, son muy

dispersos y ninguno de ellos alcanza una significación estadística tan llamativa. Mizuki (101) comunica una frecuencia significativamente mayor de A26 y menor de A11, A33, B7 y B35, y, en presencia de uveítis refractaria (134) aumento significativo de A26 y de A31 y disminución casi significativa de B62 (subtipo de B15) en pacientes japoneses. Chung (102) encuentra un descenso significativo de B16 (sus subtipos son B38 y B39) mientras que B15 es casi significativamente más frecuente. En la muestra objeto de este estudio no se encuentra ninguna diferencia entre las frecuencias de las distintas moléculas HLA-I A y B distinta de B51. Sin embargo, al estratificar a los pacientes según patología específica, sí hay diferencias: correlación negativa de A29 con formas cutáneas y neurológicas y de A24 con la articular. B15 era casi significativamente más frecuente en las formas articulares y neurológicas mientras que no se asociaba especialmente con en el resto de las series; concretamente en la serie ocular B15 era menos frecuente que en la serie control aunque sin ninguna significación estadística y, sobre todo, menos frecuente que en la series neurológica y articular, con diferencias claramente significativa ($p=0,044$ y $p=0,049$ respectivamente). Mizuki (101) encuentra una mayor frecuencia de B15 en pacientes B51 negativos que en B51 positivos. Estos datos sugieren que las formas articulares y neurológicas pueden tener marcadores HLA-I propios, distintos de B51, que confieren unas características peculiares y que

justifican el diferente comportamiento clínico y epidemiológico diferente de la enfermedad.

Los datos recogidos en la literatura, con respecto a moléculas de clase II, son muy diferentes. No solo según la muestra que se estudie sino también en función de la metodología que se emplee (serología o tipificación molecular). Con los estudios realizados con técnica serológica hay autores que no encuentran ninguna asociación significativa (102). Balboni (114), por el contrario, detecta una mayor frecuencia de DR5 y DR8; Hamza (116) disminución de DR6, asociación positiva de las formas oculares con DR2 y de las formas no oculares con DR4 y DR7; Hamza (116) y Balboni (114) detectan una mayor frecuencia de DQ3, y Mizuki (101) y Hamza (116) una menor frecuencia de DQ1. En uveítis refractaria, Matsuki (134) detecta una menor frecuencia de DR2 y DQ1 y una mayor frecuencia de DR9 y DQ3.

En conjunto, y resumiendo, las tendencias más constantes que encontramos en la revisión de la literatura, cuando se emplean técnicas serológicas, indican las siguientes asociaciones para clase II: **positiva** (series totales y oculares) con **DQ3** y **negativas** con **DQ1**.

En el presente estudio no hemos encontrado diferencias significativas, con técnica serológica entre las frecuencias

de DR y DQ entre pacientes y población control. Cuando la muestra era más reducida si detectamos una menor frecuencia de DQ1 que no se confirmó al aumentar el número de casos (135).

Al estudiar las frecuencias de los distintos alelos que codifican para locus DR y DQ Mizuki (101) (técnica de PCR-RFLP) detecta un aumento de la frecuencia de DRB1*0802 y DQB1*0303 y disminución de DRB1*0502, DQB1*0501 y DQB1*0601.

Los resultados del presente estudio, con técnica de secuencia específica de oligonucleótidos, no encuentran asociaciones con respecto a moléculas DRB1 genérico. El subgrupo de pacientes con afección ocular asociaba frecuencias algo más altas de DRB1*4 que la serie control sin alcanzar el límite de significación estadística; tan solo en la serie neurológica se comprobó una frecuencia significativamente aumentada de DRB1*10.

En cuanto a los alelos de DQ, la frecuencia de DQB1*0503 estaba disminuida en pacientes, con respecto a controles, en el límite de la significación estadística. Por el contrario, la de DQB1*0303 era algo más alta en los pacientes, aunque también en el límite de significación estadística. Sin embargo DQB1*0303 estaba significamente aumentada en pacientes con uveitis refractaría (no en los que simplemente tenían

afección ocular). Por tanto este alelo se comporta como un marcador más específico de uveitis grave que B51.

DQ1 comprende 2 subtipos: DQ5 y DQ6. Con técnica de oligotipaje DQ5 tiene 3 alelos distintos (0501, 0502, 0503) y DQ6 4 (0601, 0602, 0603, 0604). Cuando analizamos por separado la suma de las frecuencias de los distintos alelos que codifican para moléculas DQ comprobamos que la suma de los alelos de DQ5 estaba disminuida de forma casi significativa en los pacientes con EB y no se encontró ninguna diferencia para DQ6. De esta forma se puede interpretar que la disminución de la frecuencia de DQ1, descrita en la literatura, esté probablemente ligada a la disminución de su subtipo DQ5.

Además hemos detectado que las frecuencias de los diferentes alelos de DR y de DQ es distinta en pacientes y controles B51+ y B51-. Tanto DR11 como DQB1*0301, que presentan entre sí desequilibrio de enlace, se asocian a B51 tanto en controles como en pacientes pero de forma más significativa en pacientes. Este dato concuerda con el hallazgo de Balboni (114) que detecta el haplotipo B51-DR5-DQ3 más estrechamente ligado a la EB que otros haplotipos DR-DQ-B51 (DR11 es un subtipo de DR5). Por el contrario, DQ5 se asocia negativamente a B51 en pacientes, pero no en controles. Podemos suponer que, dado el posible carácter poligénico

determinante de esta enfermedad, ciertos genes pueden actuar como factores inductores o represores secundarios con respecto a otros genes "más potentes".

Este razonamiento nos ha conducido a estudiar la importancia que puede tener la presencia de haplotipos (alelos asociados por fuertes desequilibrios) en la inducción de la EB. Hemos encontrado que el haplotipo DRB1*6-DQB1*0501, que es excepcional en la mayoría de las etnias estudiadas (136), es muy infrecuente en la población control y significativamente más frecuente en paciente con EB, y especialmente en los que sufren patología ocular.

Para Mizuki (101), ninguna de las moléculas HLA-I y HLA-II (DRB1, DQB1, DQA1 y DPB1) ni el estudio de los alelos conocidos que codifican para TNF β tienen una correlación tan significativa como B51 con la enfermedad de Behçet. Él postula que debió existir un haplotipo ancestral común; que el elemento patogénico debe estar en el alelo de B51 o en una zona muy próxima a él en ese haplotipo inicial, y que las diferencias encontradas con respecto a moléculas de clase II podrían explicarse por un distinto desequilibrio de asociación con B51. Sin embargo, Goldstein no encuentra correlación entre B51 y enfermedad de Behçet en los Estados Unidos (105) y, como ya hemos mencionado, las características epidemiológicas y clínicas varían en los países donde la incidencia de

la enfermedad y de B51 es más alta con respecto a los países donde B51 y la incidencia de la enfermedad es más baja. Las objeciones que suponen las investigaciones de Goldstein a la teoría de Mizuki podrían solventarse suponiendo que la relación determinante de la EB se establece con un gen distinto, pero muy relacionado, de B51 (como afirma Mizuki), ausente en determinadas poblaciones, o bien admitiendo que, junto a factores genéticos inductores (de los que el paradigma sería B51) habría que considerar factores, genéticos, protectores. Algunos de estos factores (DQ5, DRB1*1502) tienen un distinto grado de asociación en los distintos trabajos (incluido el nuestro). Esto no es difícil de admitir si consideramos que el desarrollo de la enfermedad depende, en último término, de la suma algebraica de las influencias positivas o negativas de numerosos genes, unos más "potentes" que otros, actuando en infinitas combinaciones.

Por otro lado, y dada la distinta asociación de B51 con las diversas manifestaciones clínicas de la enfermedad podrían existir otras moléculas, otros genes, que también estuvieran implicados en la patogenia de la enfermedad y que se comportaran como marcadores de las demás manifestaciones clínicas.

Este estudio termina aquí. Pero no nuestro trabajo. Seguimos y seguiremos investigando en este campo; porque

tenemos ya la perspectiva suficiente para comprender que el estudio de la relación entre HLA y enfermedad (Behçet o cualquier otra) es una espiral continua en la que cada vuelta conquistada abre una nueva incógnita; aunque nos acerque, un paso más, al conocimiento de las leyes que rigen la las conexiones entre enfermedad y genética.

CONCLUSIONES

6.- CONCLUSIONES

I.- MOLECULAS DE CLASE I

A.- MOLECULAS HLA-A:

1) Ninguna de las moléculas tenía una distribución significativamente diferente entre controles y el total de pacientes con EB.

2) Existe una asociación negativa entre A29 y la presencia de manifestaciones cutáneas y neurológicas y de A24 con la de manifestaciones articulares.

B.- MOLECULAS HLA-B:

3) La frecuencia de B51 está significativamente aumentada en pacientes con EB con patología ocular, cutánea, trombótica o digestiva, y es menor que en la población control (aunque sin alcanzar significación estadística) en paciente con sintomatología neurológica.

4) La asociación con B51, es mucho mayor en pacientes con afección ocular y máxima en varones con uveítis refractaria.

5) En los pacientes varones con B51+ la edad de comienzo de la enfermedad es más precoz, la afección ocular más

frecuente y también más precoz, y las neurológicas más raras.

6) La distribución de B15 es inversa (con significación estadística) a la de B51: más frecuente en los subgrupos con afección articular y de SNC y más rara en la serie ocular.

7) B45 aparece con frecuencia mayor de lo esperado en las series trombótica y neurológica.

II.- MOLECULAS DE CLASE II:

8) Hay asociación negativa "casi" significativa de DQB1*0501 con los pacientes con EB, y positiva, también "casi" significativa de DQB1*0303 .

9) Se aprecia asociación positiva de DRB1*4 con manifestaciones oculares y de DRB1*10 con manifestaciones neurológicas.

10) El conjunto de alelos que codifican para moléculas DQ5 (DQB1*0501+DQB1*0502+DQB1*0503) se asocia negativamente al conjunto de pacientes con EB, especialmente a los que presentan sintomatología cutánea.

- 11) DQB1*0303 se asocia positivamente con el subgrupo de pacientes con uveítis refractaria.

- 12) DQB1*0301 se asocian positivamente al grupo de pacientes con manifestaciones cutáneas.

- 13) Encontramos que hay asociación positiva con los alelos DRB1*11 y DQB1*0301 y negativa con DQ5, en los pacientes B51+.

- 14) El haplotipo DRB1*6-DQB1*0501, excepcional en la población control y es significativamente más frecuente en los pacientes, especialmente en los que presentan afección ocular.

RESUMEN

7.- RESUMEN

La enfermedad de Behçet (EB), descrita por Hulusi Behçet, en 1937, en 2 pacientes que presentaban ulceraciones orales y genitales e iritis con hipopion, es una enfermedad de etiología desconocida en la que los estudios epidemiológicos hacen sospechar que existen factores geográficos, ambientales y genéticos que la condicionan.

El diagnóstico de EB se apoya exclusivamente en datos clínicos ya que no existe ningún marcador clínico, biológico ni histológico de la enfermedad y, hasta ahora, no hay unidad de criterios diagnósticos ya que la eficacia de los distintos sistemas varía de un país a otro.

Casi 60 años después de la descripción inicial de la enfermedad de Behçet (EB), sigue existiendo una importante inseguridad diagnóstica, lo que conlleva una difícil estimación de su verdadera incidencia y de su epidemiología.

Desde los estudios de Ohno en 1972, se conoce la mayor frecuencia de HLA-B5 (subtipo B51) en los pacientes con EB, sobre todo en los países donde la frecuencia de este alelo es alta en la población general, y se investiga su papel como marcador de la enfermedad y como elemento diagnóstico y pronóstico en los pacientes.

Por otro lado existen claras diferencias en la distribución geográfica dicha asociación y, así mismo, se están estudiando otras moléculas del sistema HLA en la EB para intentar profundizar en sus relaciones genético-clínicas.

En los últimos años se han desarrollado varias técnicas para la tipificación HLA a nivel molecular mediante tipificación HLA-ADN: determinación de la variación en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) y métodos basados en la amplificación, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), de segmentos que codifican las porciones más polimórficas de las moléculas, con oligonucleótidos específicos se secuencia. Es esta última técnica, dado su avanzado poder discriminante para el análisis molecular, la que hemos empleado, en el estudio de moléculas de clase II, como complemento de métodos serológicos clásicos.

La justificación de este trabajo es el estudio sistemático del sistema HLA en un grupo de 71 pacientes con EB, procedentes de una zona geográfica concreta (Andalucía) con los siguientes objetivos:

- 1.- Analizar la asociación de las moléculas de clase I y II con la EB en nuestro entorno, empleando, junto a métodos serológicos (moléculas clase I y II), técnicas de estudio de ADN mediante PCR-SSO.

2.- Estudiar las posibles correlaciones entre las distintas moléculas HLA y la sintomatología clínica.

3.- Valorar el papel de las moléculas HLA como elementos diagnósticos y/o pronósticos en la EB.

Las conclusiones más importantes que se han obtenido son las siguientes:

Ninguna de las moléculas HLA-A tenía una distribución significativamente diferente entre controles y el total de pacientes con EB. No obstante, existe una asociación negativa entre A29 y la presencia de manifestaciones cutáneas y neurológicas y de A24 con la de manifestaciones articulares.

En cuanto a HLA-B, la frecuencia de B51 está significativamente aumentada en pacientes con EB con patología ocular, cutánea o digestiva, y es menor que en la población control (aunque sin alcanzar significación estadística) en paciente con sintomatología neurológica.

La asociación con B51, es mucho mayor en pacientes con afección ocular y máxima en varones con uveítis refractaria y, en los pacientes varones con B51+, la edad de comienzo de la enfermedad es más precoz, la afección ocular más fre-

cuenta, y también más precoz, y las manifestaciones neurológicas son más raras.

La distribución de B15 es inversa (con significación estadística) a la de B51: más frecuente en los subgrupos con afección articular y de SNC y más rara en la serie ocular y B45 aparece con frecuencia mayor de lo esperado en las series trombótica y neurológica.

Para moléculas de clase II hay asociación negativa de DQB1*0501 y positiva de DQB1*0303 con los pacientes con EB (ambas asociaciones de forma "casi" significativa).

Se aprecia asociación positiva de DRB1*4, muy cercana a la significación estadística, con manifestaciones oculares, y de DRB1*10 con manifestaciones neurológicas.

El conjunto de alelos que codifican para moléculas DQ5 (DQB1*0501+DQB1*0502+DQB1*0503) se asocia negativamente al conjunto de pacientes con EB, especialmente a los que presentan sintomatología cutánea.

DQB1*0303 se asocia positivamente con el subgrupo de pacientes con uveítis refractaria, por lo que podemos considerarlo como un indicador de gravedad y, por último, las manifestaciones cutáneas se asocian positivamente a DQB1*0301

y negativamente con el conjunto de los alelos que codifican para DQ5.

En los pacientes con EB hay asociación positiva de B51 con DRB1*11 y DQB1*0301 y negativa con DQ5.

El haplotipo DRB1*6-DQB1*0501, excepcional en la población control y es significativamente más frecuente en los pacientes, especialmente en los que presentan afección ocular.

BIBLIOGRAFIA

8.- BIBLIOGRAFIA

1.- Commemorative lecture for Professor D. Hulûsi Behçet. In Dilsen N, Koniçe M, Övül C, eds: Behçet's Disease. Proceedings of an International Symposium on Behçet's Disease, Istambul, 29-30 September 1977. Amsterdam-Oxford: Excerpta Médica, 1979:1-5

2.- Feigenbaum A. Description of Behçet's disease syndrome in Hipocratic third book of endemic disease. Br M Ophtalmol 1956;40:355-357

3.- Blüthe l. Zur Kenntnis des recidiverende Hypopyons. Inaugural Thesis. Heidelberg, 1908.

4.- Planner H, Remenovsky F. Beiträge zur Kenntnis der ulcerationen am äusserem weiblichem Genitale. Arch Dermat U Syph 1922;140:162-188.

5.- Adamantiades B. Sur un cas d'iritis a hypopyon récidivant. Annales d'oculistique 1931;168:271-278.

6.- Blobner F. Zur rezidivierenden hypopyon-iritis. Zetschrift Augenheilkd 1937; 91:129-139.

- 7.- Sánchez Román J, Castillo Palma MJ, Navarrete Ortega M, Marín García E, Rodríguez Cañas T. Valoración anatomopatológica de la reacción patérgica en andaluces con enfermedad de Behçet. En Prensa.
- 8.- Hamza M. Pathologie et physiopathologie de la maladie de Behçet. Revue du Rhumatisme, 1988;55:771-7786.
- 9.- International Study Group for Behçet's Disease. Criteria for diagnosis of Behçet's disease. Lancet 1990i;335:1078-1080.
- 10.- Mason RM, Barnes CG. Criteria for diagnosis and classification of Behçet's syndrome. In Lehner T, Barnes CG eds: Behçet's Syndrome. Clinical and immunological features. Proceedings of a conference sponsored by Royal Society of Medicine, February 1979, London, Academic Press, 1979:1-9.
- 11.- O'Duffy JD, Goldstein NP. Neurological involvement in seven patients with Behçet's disease. Am J Med 1976;61:170-178.
- 12.- Shimizu T, Ehrlich GE, Inaba G, Hayashi K, Behçet's disease (Behçet's syndrome). Semin Arthritis Rheum 1979;8:233-260.

13.- Touarine A, L'aphtose. Bull Soc Franç Derm Syph 1941;48: 61-68.

14.- Lehner T, Barnes CG. Oral ulcerations and Behçet's syndrome. Gut 1977;18:491-511.

15.- Nussemblat RB and Palestine AG. Behçet's disease and other retinal vasculitis. En Uveítis. Fundamental and clinical practice. Chicago. Year Book Medical Publisher, 1989; 212-231.

16.- Teter MS, Hochberg C. Diagnostic criteria and epidemiology. In Behçet's disease: a contemporary Synopsis. Plotkin GR, Calabro JJ, O'Duffy JD edd. Futura Publishing CO.INC. Mount Kisko New York, 1988 pp 15-17.

17.- Chajek T, Farinau M. Behçet's disease. Report of 41 cases and a review of the literature. Medicine (Baltimore) 1975;54:- 179-196.

18.- Ohno S, Aoki K, Sugiura S, Nakayama E, Itokura K, Aizawa M. HLA-5 and Behçet's disease. Lancet 1972;2:1383-1384.

19.- Ohno S, Ohguchi M, Hirose S et al. Close association oh HLA-Bw51 with Behçet's disease. Arch Ophtalmol 1982, 100, 1455-1458.

20.- Aoki K, Fujioka K, katsumata H, et al. Epidemiological studies on Behçet's disease in the Hokkaido district. Jpn J Clin Ophtal 1971;25:2239-2248.

21.- Maeda K, Nakae K. Recent epidemiological review on Behçet's disease. Asian Med J 1977;20:568-582.

22.- Hussain L, Ward R, Lehner T, Barnes CG. Herpes Simplex virus IgG, IgM and IgG subclass from sera of patients with Behçet's disease and controls. En Lehner T, Barnes CG. Recent advances in Behçet's Disease 1986; 73. Royal Society of Medicine, London.

23.- Bonass WA, Stewart JA, Chamberlain MA, Halliburton IW. Molecular studies in Behçet's disease. En Lehner T, Barnes CG. Recent advances in Behçet's Disease 1986; 37. Royal Society of Medicine, London.

24.- Eglin RP, Lehner T, Subak-Sharpe JH. Detection of RNA complementary to Herpes Simplex virus in mononuclear cells from patients with Behçet's syndrome and recurrent oral ulcers. Lancet 1982; ii:1356.

25.- Young C, Lehner T, Barnes CG. CD4 and CD8 cell response to herpes simplex virus in Behçet's disease. Clin Exp Immunol 1988; 73:6-10

26.- J Sánchez Román, MJ Castillo Palma, R Torronteras Santiago, JM Varela Aguilar, F Lopez Checa, F Sánchez García. Virus del Herpes Simple tipo I, fenotipo HLA y enfermedad de Behçet. Med Clin (Bar) 1992;98:366-368.

27.- Cooper C. Pippard EC. Sharp H. Wickham C. Chamberlain MA. Barker DJ. Is Behçet's disease triggered by childhood infection? .Ann Rheum Dis. 1989 May. 48(5). P 421-3.

28.- Hirohata S, Oka H, Mizushima Y. Streptococcal related antigens stimulate production of IL-6 and interferon-gamma by T cells from patients with Behçet's disease. Cell Immunol, 1992;140:410-419

29.- Sakane T, Kutani H, Takada S, Tsunematsu T, .- Functional aberrations of T cells subset in patients with Behçet's disease. Arthritis Rheumatism, 1982;25:1342-1351.

30.- Palmares J, Delgado L, Candeias J, Araújo J, Torrinha JF. "Supressor-inducer" T cell subsets in uveitis. En 2nd Congress of immunointervention in Autoimmune diseases. París (Francia) 1991. pp 153.

31.- Sigiura S, Aoki K, Kono M, Safurada M, Soto N. Serum antibodies to various pathogenic agents and lymphocytic transformation in Behçet's disease. Acta Soc Ophtal Jap, 1972;76:635.

32.- Ohno S. Immunological aspects of Behçet's disease and Vogt-Koyanagi-Harada's disease. Trans.Optthal.Soc.U.K., 1981;-101:335-341.

33.- Kaneko F, Takahashi Y, Muramatsu R, Hadachi X, Miura Y, Nakani A, Minagawa T. Natural killer cell numbers and function in peripheral lymphoid cells in Behçet's disease. Br J Dermatol 1985; 113:313-315.

34.- Hamzaoui K, Ayed Kh, Hamza M, Touraine JL. Natural killer cells in Behçet's disease. Clin Exp Immunol, 1988;71:126-131.

35.- Susuki N, Sakane T, Ueda Y, Tsunematsu T. Abnormal B cell function in patients with Behçet's disease . Arthritis Rheum 1986;29:212-219.

36.- Levinsky RJ, Paganelli R, Lehner T. Immune complexes and their characterization in Behçet syndrome and recurrent oral ulcers. Proceedings of a conference sponsored by the Royal Society of Medicine, February 1979. London Academic Press, 1979:13-32.

- 37.- Chi-Chao C, Palestine AG, Nussenblant RB, Roberge FG, Benezra D. Anti-retinal autoantibodies in Vogt-Koyanagi-Harada syndrome, Behçet's disease and sympathetic ophtalmia. *Ophtalmology*, 1985;92:1025-1028.
- 38.- Lehner T. Behçet's syndrome and autoimmunity. *Br Med J* 1967;1:465-467.
- 39.- Maori Y, Takeuchi A, Mori M, et al. Antinuclear antibody in Behçet's disease (letter). *J Rheumathol*. 1982;9:809-810.
- 40.- Inaba G, Aoyama J. Anti-glycolipid antibodies in neuro-Behçet syndrome. En Inaba G, ed. *Behçet's Disease Pathogenic Mechanism and Clinical Future. Proceedings of the International Conference of Behçet's disease. 23-24 ocubre 1981, Tokyo, University of Tokyo Press, 1982:145-152.*
- 41.- O'Duffy JD, Robertson DM, Golstein NP. Cholrambucil in the tratment of uveitis and meningoencephalitis of Behçet's disease. *Am J Med* 1984;76:75-84)
- 42.- Efthimiou J, Harris EN, Hughes GRV. Negative anticardiolipin antibodies and vascular complications in Behçet's syndrome *Ann Rheum Dis* 1985;44:725-726.

43.- Hull RG, Harris EN, Chavarri AE, et al. Anticardiolipin antibodies: occurrence in Behçet's syndrome. *Ann Rheum Dis* 1984;43:746-748.

44.- Mizushima Y. Chemotaxis and phagocytosis in Behçet's disease. En Lehner T, Barnes CG(eds): *Recent Advances in Behçet's disease*. London, Royal Society of Medicine Services, 1986 pp 235-246.

45.- Mastsumura N, Mizushima Y. Leucocyte movement and colchicine treatment in Behçet's disease. *Lancet* 1975; 2:813.

46.- Efthimou J, Addison IE, Johnson BV. In Vivo leucocyte migration in Behçet's syndrome. *Ann Rheum Dis* 1989; 48:206-210.

47.- Aoki Y, Yoshida M, Kominami E. Enzyme immunoassay of medullasin in peripheral blood. *Clin Chim Acta* 1988;178(2): 193-204.

48.- Muniain Ezcurra MA. Liberación de superóxido, quimiotaxis y fenómeno patérgico en pacientes con enfermedad de Behçet. En Graña Gil J, ed: *II Symposium Internacional sobre enfermedad de Behçet. I reunión del Grupo Ibérico sobre Enfermedad de Behçet*. Barcelona, Ediciones Consulta S.A. 1991:81-88)

49.- Sakane T, Suzuli N Ueda Y, et al. Analisis of interleukin-2 activity in patients with Behçet's disease. Ability of T cells to produce and respond to interleukin-2. Arthritis Rheum 1986;29: 371-378.

50.- Nussemlat RB and Palestine AG. Behçet's disease and other retinal vasculitis. En Uveítis. Fundamental and clinical practice. Chicago. Year Book Medical Publisher, 1989; 212-231. pp 38-46.

51.- Schiffenbauer J, Schwartz BD. The HLA complex and its relationship to rheumatic disease. Rheum Dis Clin N Am 1987; 13: 463-485).

52.- Duquensnoy RJ. Immunogenetic of the human Major Histocompatibility Complex. Clinics in Laboratory Medicine 1991;11:509-535.

53.- McDeviti. El sistema HLA y su relación con la enfermedad. Hospital Practice (ed. española) 1986;1:93-110.

54.- Brewerton DA, Caffrey M, Nicholls A, et all: Ankylosing spondylitis and HLA-A27. Lancet 1973i:904-907.

55.- Trowsdale J, Ragoussi JCampbell RD. Map of the human MHC. Immunology Today 1991; 12:443-446.



56.- Goodfellow PN, Jones EA, van Heyingen V, Solomom E, Bobrow M, Miggiano V, Bodmer WF. The β 2-microglobulin gene is on chromosome 15 and not in the HLA region. *Nature* 1975; 224: 267-269.

57.- Bjorkman PJ, Pharma P. Structure, function and diversity of class I major histocompatibility complex molecules. *Annue. Rev. Biochem* 1990; 59:253-288.

58.- Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennet WS, Strominger JL, Wiley DC. The foreign antigen binding site and T cell recognition of class I histocompatibility complex molecules. *Nature* 1987b; 329:253-288.

59.- Orr HT, Lancet D, Robb RJ, Lopez de Castro JA, Strominger JL. The heavy chain of human histocompatibility antigen HLA-B7 contains an Ig-like region. *Nature* 1979; 282:266-270.

60.- Robinson MA, Kindt TJ. Major Histocompatibility Complex antigens and genes. In Paul WE (ed). *Fundamental Immunology*. Raven Press, New York 1989; pp489-539.

61.- Geraghty DE, Koller BH, Orr HT. A human histocompatibility complex class I gene that encodes a protein with a shortened cytoplasmic segment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1987; 84:9145-9149.

62.- Koller Bh, Geraghty DE, DeMars R, Duvick L, Rich SS, Orr HT. Chromosomal organization of the human major histocompatibility complex class I gene family. *J EXP Med.* 1989; 85:45-86.

63.- Malissen M, Malissen B, Jordan BR. Exon/intron organization and complete nucleotide sequence of HLA gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1982;893-897.

64.- Ragoussis J, Bloemer K, Pohla H, Messer G, Weiss EH, Ziegler A. A physical map including a new class I gene (cda12) of the human histocompatibility complex (A2/B13 haplotype) derived from a monosomy 6 mutant cell line. *Genomics* 1989; 4: 301-308

65.- Messer G, Zemmour J, Orr HT, Pharham P, Weiss EH, Girdlestone J. HLA-J: a second inactivated class I HLA gene related to HLA-G and HLA-A. Implications for the evolution of the HLA related genes. *J. Immunol* 1992; 148:4043-4053.

66.- Pober JS, Guild BC, Strominger JL. Phosphorylation in vivo and in vitro of human histocompatibility antigens (HLA-A and HLA-B) in the carboxy-terminal intracellular domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1978; 75:6002-6006.

67.- Sodoyer R, Damotte M, Delovitch TL, Trucy J, Jordan BR, Strachan T. Complete nucleotide sequence of a gene encoding a functional human class I histocompatibility antigen (HLA-Cw3). EMBO J. 1984; 3:879-885.

68.- Strachan T, Sodoyer R, Damotte M, Jordan BR. Complete nucleotide sequence of a functional class I HLA gene, HLA-A3: implications for the evolution of HLA genes. EMBO J, 1984; 3:887-894.

69.- Koller BH, Orr HT. Cloning and complete sequence of an HLA-A2 gene: analysis of the two HLA alleles at the nucleotide level. J Immunol 1985; 134: 2727-2733.

70.- Holmes N, Parham P. Exon shuffling in vivo can generate novel class I molecules. EMBO J 1985; 4:2849-2854.

71.- Ways JP, Copping HL, Parham P. The complete primary structure of the HLA-Bw58. J. Biol Chem. 1985; 260:11924-11933.

72.- Bodmer JG, Marsh SGE, Alber ED, Bodmer WF, Dupont B, Erlich HA, Mach B, Mayr WR, Parham P, Sasazuki T, Schreuder GMY, Strominger JL, Svejgaard A, Terasaki PI. Nomenclature for Factors of the HLA System, 1991. Hum Immunol 1992; 34:4-18.

73.- Kaufman JF, Auffary C, Korman AJ, Shackelford DA, Strominger JL. The class II molecules of the human and the murine major histocompatibility complex. *Cell* 1984; 36:1-13.

74.- Kavathas DeMars R, Bach FH, Shaw S. SB: a new HLA-linked human histocompatibility gen defined using HLA-mutant cells line. *Nature* 1981; 293:747-749

75.- Auffray C, Kuo J, DeMars R, Strominger JL. A minimum of four human class II α -chain genes are encoded in the HLA region of the chromosome 6. *Nature* 1983; 304:174-177.

76.- Levine F, Ehrlich H, Mach B, Leacg R, White R, Pious D. Deletion mapping of HLA and chromosome 6p genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1985;3741-3745.

77.- Hardy DA, Bell JI, Long EO, Linsten T, McDevitt HO. Mapping of the class II region of the major histocompatibility complex by pulsed-field gel electrophoresis. *Nature* 1990; 323:1277-1289.

78.- Trowsdale J, Young JA, Kelly AP, Austin PJ, Carson S, Meunier H, So A, Erlich HA, Spielman RS, Dodmer J. Structure, sequence and polymorphism in the HLA-D region. *Immunol. Rev.* 1985; 85:5-43.

79.- Rodey GE, Fuller TC: Public epitopes and antigenic structure of the MHLA molecules. CRC. Crit. Rev. Immunol. 1987; 7:229-267

80.- Todd JA, Bell JI, McDevitt HO. HLA-DQ β gene contributes to susceptibility and resistance to insulin dependent diabetes mellitus. Nature 1987; 329:599-604.

81.- Auffray C, Lillie JW, Korman AJ, Boss JM, Frechin N, Guillemot F, Cooper J, Mulligan RC, Strominger JL. Structure and expression of HLA-DQ α region and DX α genes: Intrallelic alternate splicing of the HLA-DQ α gene and functional splicing of the HLA-DQ α gene using a retroviral vector. Immunogenetics 1987; 26:63-73

82.- Gong QL, Gregersen PK, Karr RW, Silver J. Recombination between DQ α y DQ β genes generates human histocompatibility leukocyte antigen class II haplotype diversity. J Immunol 1987; 139:2993-2995.

83.- Kappes DJ, Strominger JL. Structure and evolution of the HLA class II SXB gene. Immunogenetics 1986; 24:1-7.

84.- Duasset J. Iso-leuco-anticorps. Acta Haematol 1959; 20:156-159.

- 85.- Terasaki PI, Mc Clelland JD. Microdroplet assay of human serum cytokins. *Nature (Lond)* 1964; 204:998.
- 86.- Hirshberg H, Kaakine H, Thorsby E. Typing for HLA-D determinants. Comparison for typing results using homozygous stimulating cells and primed cultures. *Tissue Antigens* 1976; 16:335-367.
- 87.- Nuñez-Roldán A, Sasportes M, Fradeliz D. Análisis of products involved in primary and secondary allogenic proliferation in man. *Immunogenetics* 1978; 6:43-54.
- 88.- Charron DJ, McDevitt HO. Analysis of the HLA-D region associated molecules with monoclonal antibody. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 1979; 76:6567-6571.
- 89.- Wake CT, Long EO, Strubin M, Gross N, Accolla R, Carrel S, Mach B. Allelic polymorphism and complexity of the genes of the HLA DR β chains-direct analysis by DNA-DNA hybridation. *Nature* 1982; 300:372-374.
- 90.- Saiki RK, Bugawan TL, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Analysis of enzymatically amplified β -globin and HLA-DQ α DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature* 1986; 324:163-166.

91.- Maeda M, Murayama N, Ishi H, Uryu N, Ota M, Tsuji K, Inoko H. A simple and rapid method for HLA-DQA1 genotyping by digestion of PCR-amplified DNA with allele specific restriction endonucleases. *Tissue antigens* 1989; 34:290-298.

92.- Olerup O, Zetterquist H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigens* 1988; 33:30-37.

93.- Sinha AA, Lopez MT, McDevitt HO. Autoimmune disease: the failure of self tolerance. *Science* 1990; 248:1380-1388.

94.- Townsend A, Bodmer H. Antigen recognition by class I-restricted T lymphocytes. *Ann Rev Immunol* 1989; 7:601-624

95.- Brown J, Jardetzky T, Saper M, Samraoui B, Bjorkman P, Wiley D. A hypothetical model of the foreign antigen binding site of class II histocompatibility molecules. *Nature* 1988; 332:845-848.

96.- Woolf B. On estimating the relation between blood group and disease. *Ann Hum Genet* 1955;19:251-253.

97.- Yacizi H, Chamberlain M, Schreuder J, D'Amaro J, Mutfuglu M. HLA antigens in Behçet's disease. A reappraisal by a comparative study of Turkish and British patients. *Annals of Rheumatic Disease* 1980;39:344-348

98.- Baricordi OR, Sensi A, Pivetti-Sensi Pezzi P, et al. Behçet's disease associated with HLA-B51 and Drw52 antigens in Italians. *Hum Immunol* 1986;17:297-301

99.- Zervas J. Vayopoulos G. Sakellaropoulos N. Kaklamanis P. Fessas P. HLA antigens and Adamantiades-Behçet's disease (A-BD) in Greeks. *Clin Exp Rheumatol*. 1988 Jul-Sep. 6(3). P 277-80.

100.- Godeau P, Wechsler B. Maladie de Behçet, Maladie d'actualité. *Journal Maladies Vasculaires (Paris)*, 1988;13:215-219.

101.- N Mizuki, S Ohno, H Tanaka, K Sugimura, T Seki, N Mizuki, J Kera, G Inaba, K Tsuji, H Inoko. Association of HLA-B51 and lack of association of class II alleles with Behçet's disease. *Tissue Antigens* 1992;40:22-30.

102.- Chung Y-M, Tsai S-T, Liao F, Liu J-H. A genetic study of Behçet's disease in Taiwan Chinese. *Tissue Antigens* 1987;30:68-72)

103.- Levalle C, Alarcon-Segovia D, Delguidice_Knipping J A, Fraga A. Association of Behçet's syndrome with HLA-B5 in Mexicans Mestizo population. J Rheumatol, 1981;8:325-327.

104.- Chamberlain MA. Behçet's syndrome in 32 patients in Yorkshire. Ann Rheum Dis 1977;36:491-499.

105.- O'Duffy JD. Behçet's disease. In Kelly WN, Harris Ed Jr, Ruddy S, Sledge CB, eds: Textbook of Rheumatology. Philadelphia, WB Saunders, 1985:1174-1178.

106.- Djawari D, Lang B, Hornstein OP. HLA tipyng in german patients with recurrent bening aphtosis and Behçet's disease. Z Hautzk, 1984;59:1005-1009.

107.- Yurdakul S. Gunaydin I. Tuzun Y. Tankurt N. Pazarli H. Ozyazgan Y. Yazici H. The prevalence of Behcet's syndrome in a rural area in northern Turkey. J Rheumatol. 1988; 15: 820-822.

108.- J Graña, J. Sanchez Bursón, A Atanes, A Montoya, C Alonso y F Galdo. Enfermedad de Behçet y HLA en Galicia. Rev Esp Rheumatol 1987;14:214-217.

109.- González T, Gantes M, Bustabad S. Epidemiología de la enfermedad de Behçet en las Islas Canarias. En Graña Gil J, ed: II Symposium Internacional sobre enfermedad de Behçet. I reunión del Grupo Ibérico sobre Enfermedad de Behçet. Barcelona, Ediciones Consulta S.A. 1991:23-26.

110.-Lehner T, Batchelor JR,. Classification and immunogenetics basis of Behçet's syndrome. In Lehner T, Barnes CG, eds: Behçet's syndrome. Clinical and immunological features. Proceedings of a conference sponsored by the Royal Society of Medicine, February 1979. London Academic Press, 1979:13-32.

111.- Hamza M. Ayed K, Benayed H. Systèm HLA et maladie de Behçet. Sem. Hôp. Paris 1986; 62:1314-1316.

112.- Ohno S, Sugiura S, Waikizaka A, Aizawa M. HLA-Bw51 and Behçet's disease. JAMA 1978; 240-244

113.- Hayashi H, Dennis PD, Ariga H, Salter RD, Parham P, Kyoichi K, Takiguchi M. HLA-B51 and HLA-B52 differ by only two amino acids which are in the helical region of the Ó1 domain. J Immunol 1989;1:306-311

114.- A Balboni, P Pivetti-Pezzi, P Orlando, M Rubini, R Selvatici, M Accorinti, O R Baricordi, E Gandini. Serological and molecular HLA typing in Italian Behçet's disease: significant association to B51-DR5-DQw3 haplotype.

115.- J Numaga, K Matsuki, M Mochizuli, M Minami, T Juji. An HLA-D region restriction fragment associates with refractory Behçet's disease. Am. J. Ophthalmology 1988;105:528-523.

116.- M Hamza, K Ayed, R Bardi, Y Gorgi, N Meddeb. Maladie de Behçet et antigènes classes II et III du complexe majeur d'histocompatibilité. Revue du Rhumatisme 1990;57:59-61

117.- Ohno S, Asanuma T, Suguira S, Waikasaka A, Aizawa M. In Lehner T, Barnes CG (eds): Recent Advances in Behçet's disease. London, Royal Society of Medicine Services, 1986 pp 11-15.

118.- Fernandez-Viña M, Morales ME, Stasny P: DNA typing for class II HLA antigens with allele-specific or group-specific amplification. Human Immunology 1991;30:60-68.

119.- Mach B, Tiercy JM. Genotypic Typing of HLA class II: from the bench to de bedside. Hum Immunol 1991; 30:278-284.

120.- Mehra NK, Verduijn W, Taneja V, Drabbles J, Singh SPN, Giphart MJ. Analysis of HLA-DR-2-associated polymorphism by oligonucleotide hybridization in an Asian Indian population. Hum. Immunol 1991; 32:246-253.

121.- Wood WI Gitschier J, Lasky LA, Lawn RM. Base composition independent hybridization in tetramethylammonium chloride: a method for oligonucleotide screening in highly complex gene libraries. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1985; 82:1585-1588.

122.- Haldane JBS. The estimation and significance of the logarithm of a ratio of frequencies. Ann Hum Genet 1956;2:309-311.

123.- Oshima Y, Shimuzi T, Yokohari R, et al. Clinical Studies on Behçet's syndrome. Ann Rheum Dis 1963;22:36-45.

124.- J Carratalá, R Moreno, H Knobel, A Vidaller, J Bosch, A San José, Badrinas F, Fernandez-Nogués F. Enfermedad de Behçet. Estudio de 52 pacientes del area de Barcelona. Rev Esp Rheumato 1987;14:218-223.

125.- E Rodríguez Illera, M Praga Terente, P España Saz, A Durántez Martín. Síndrome de Behçet: presentación de 9 casos. Med Clin (Barcelona) 1977;69:331-335.

126.- J Mitjá, JA Olmo, J Granados, J Rotés, J Muñoz, M Centellas, A Brancós. Síndrome de Behçet. Revisión a propósito de 11 casos. Rev Esp Rheum 1976;3:177-188.

127.- I Mateo Bernado, J Grijon, E Martín, JL Postigo, R Muñoz, P Fernández. Presentación de 9 casos y revisión de la literatura. Rev Clin Esp 1979;4:283-290.

128.- Colvard DM, Robertson DM, O'Duffy JD. The ocular manifestations of Behçet's disease. Arch Ophthalmol 1977;95:1813-1817.

129.- Caminero Luna JA. Epidemiología de la tuberculosis en España, en Caminero Luna JA, ed. Tuberculosis. España Gráficas Letra S.A. 1991, 19-28)

130.- Hamza M, Ayed K, Elleuch M, Benayed H. Fréquence de l'antigène HLA-B5 au cours de la maladie de Behçet. Nouv Presse Méd. 1978;7:3263.

131.- Okuyama T, Kunikane, Kasahara M, Ohno S, Aizawa M, Conighi C, Perrone Sm Mattiuz PL. Behçet's Disease. In Histocompatibility Testing 1984, eds. Albert E.D. et al. pp 397-402. Springer-Verlag, Berlin.

132.- Mishima S, Masuda K, Izawa Y, et al: Behçet's disease in Japan: Ophthalmologic aspects. Trans Am Ophthalmol Soc 1979;76:225-279.

133.- Inaba G. Clinical features of neuro-Behçet syndrome, in Lehner T, Barnes CG(eds): Recent Advances in Behçet's disease. London, Royal Society of Medicine Services, 1986 pp 235-246.

134.- Matsuki K, Juji T, Tokunaga K, Mochizuki M, Hayashi K, Fujino Y, Numaga J, Yamashita H. HLA antigens in Behçet's disease with refractory ocular attacks. Tissue antigens 1987; 29:208-213.

135.- J Morales, J Yélamos, J Sanchez Román, M J Castillo Palma, M Romero, A Nuñez Roldán, MF Gonzalez. Decrease of HLA-DQ1 frequency in Behçet disease in Andalusia (Spain). VIIth European Conference of Histocompatibility. Stresa (Italia), 18-22 de marzo de 1993.

136.- Fernandez-Viña MA, Gao X, Moraes ME, Moraes JR, Salatíel I, Miller S, Tsai J, Sun Y, An J, Larysse Z, Gazit E, Brautbar C, Stastny P. Alleles at four class II loci determined by oligonucleotide hybridization and their associations in five ethnic groups. Immunogenetics 1991;34:299-231.

137.- Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Strominger JL, Wiley DC. Structure of the human class I histocompatibility antigen HLA-A2. *Nature* 1987a; 329:506-512.

138.- Tiercy JM, Jeannet M, Mach B. A new HLA-DRB1 allele within the DRw52 supertypic specificity (Dw13-DWHAG). sequencing and direct identification by oligonucleotide typing. *Eur J. Immunol.* 1990;20:237-241.

139.- Charron D. Molecular basis of human leukocyte antigen class II disease association. *Adv. Immunol.* 1990; 48:107-159.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Reunido el Tribunal Integrado por los abajo firmantes
en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de
D. Maria Jesús Castillo Palacios
titulada "Estudio comparado de verbos de clase I y II
del C.H.H. La opacación como índice diagnósticos y
pragmáticos en la enseñanza de Behçet"
acordó otorgarle la calificación de Apto cum laude

Sevilla, 26 de Noviembre 1993

El Vocal,



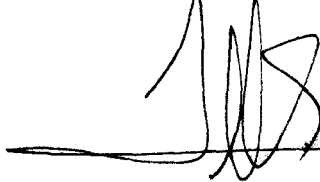
El Presidente



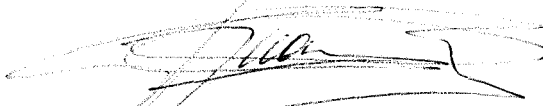
El Vocal,



El Secretario,



El Vocal,



El Doctorado,

